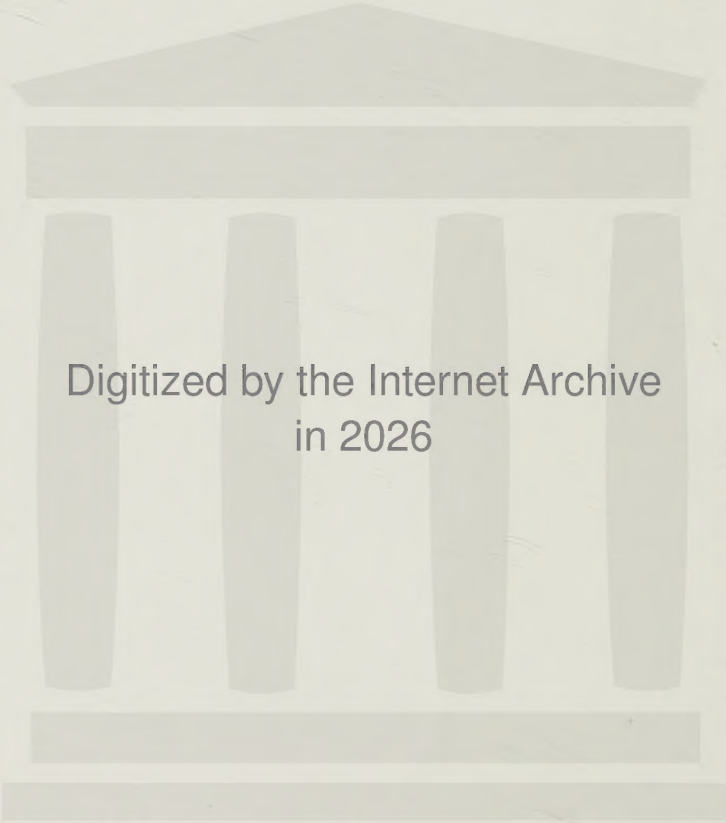


ZUR SELEKTIVEN TRANSKRIPTION DURCH RNA POLYMERASE

Bernd Rauschel

*Diss
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0011

**ZUR SELEKTIVEN TRANSKRIPTION
DURCH RNA POLYMERASE**

Dissertation

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Bernd Rauschel

München

1985

Dissertation eingereicht am 10.12.85

- 1. Gutachter: Prof. Dr. G. Hartmann**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker**

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.86

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Herrn Dr. H. Domdey, München, danke ich für die Durchführung der RNA-Sequenzanalyse und für wertvolle Tips.

Steffi Klüpfel-Stahl und Claudia Dubler danke ich für E. coli und M. luteus RNA-Polymerase-Präparationen.

Herrn Dr. G. Greull danke ich herzlich für wertvolle Ratschläge zur Enzymisolierung.

Weiterhin möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen in unserem Institut für ihre Hilfsbereitschaft, guten Ratschläge und zahlreichen Diskussionen danken.



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
PROBLEMSTELLUNG	2
MATERIAL	3
Bakterienstämme, Plasmide, Bakteriophagen	3
Enzyme	3
Nukleinsäuren und Nukleotide	5
Chemikalien, Nährmedien und andere Materialien	5
METHODEN	8
Bakterien und Phagenvermehrung	8
Bakterienzüchtung	8
Isolierung von Einzelkolonien	8
Aufzucht in Flüssigkultur	9
Herstellung transformationskompetenter Bakterien	9
Transformation von Bakterien	10
Phagenvermehrung	12
Züchtung von <u>E. coli</u> K803 Zellen für die Lambda-Vermehrung	12
Vermehrung des Bakteriophagen Lambda	12
<u>In vitro</u> Verpackung von Lambda-DNA	12
Isolierung von DNA	13
Isolierung von zellulärer DNA aus <u>M. luteus</u>	13
Isolierung von Lambda-DNA und Plasmid-DNA	14
Isolierung einzelsträngiger M13-Phagen DNA	15
Isolierung von DNA aus Agarosegelen	16
Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen	16
Reinigung und Konzentrierung von DNA und RNA	16

	Seite
Enzymatische Reaktionen an DNA	17
Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen	17
Hydrolyse von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase	17
³² P-Markierung von DNA-Fragmenten mit T4-Polynukleotidkinase	18
Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Enzym	18
Kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase	18
DNA-Sequenzierung an einzelsträngiger DNA nach dem Dideoxyverfahren	19
Identifizierung rekombinanter DNA	21
Schnelle Methoden zur Isolierung von Plasmid-und Lambda-DNA	21
<u>In situ</u> Hybridisierung von Bakterienkolonien	21
<u>In situ</u> Hybridisierung von Bakteriophagenplaques	22
Southernblot-Hybridisierung	22
Anreicherung der RNA-Polymerase aus <u>M. luteus</u>	23
Enzymatische Reaktionen mit RNA-Polymerase	23
<u>In vitro</u> RNA-Synthese unter Standardbedingungen	23
Synthese von γ - ³² P-markierter RNA	24
Nukleotid-Sequenz-Analyse des 5'-Terminus von RNA nach der "mobility-shift"-Methode	25

	Seite
Gelelektrophoresen	26
Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	26
Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	26
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	26
Denaturierendes Polyacrylamidgel für RNAs	27
Denaturierendes Polyacrylamidgel zur DNA-Sequenzierung	28
ERGEBNISSE	30
<u>In vivo</u> Spezifität des <u>M. luteus</u> Promotors	30
Klonierung in pPV33	30
Identifizierung der Klone	32
Orientierung der klonierten DNA	33
<u>In vivo</u> Aktivität in <u>E. coli</u>	35
Transkriptionsselektivität verschiedener <u>M. luteus</u> RNA Polymerase Präparationen	37
Charakterisierung der Präparationen	38
Anreicherung nach Burgess und Jendrisak (1975)	38
Chromatographie an Heparin-Sepharose und Phosphocellulose	45
Fraktionierung von RNA Polymerase Rohextrakt an DNA-Agarose und Phosphocellulose	47
Standardisolierung der <u>M.luteus</u> RNA Polymerase nach Lill <u>et al.</u> (1977)	51
Vergleichende Transkription an verschiedenen Matrizen	52
Transkription an <u>E. coli</u> Plasmid pBR322	52
Transkription an Lambda-DNA	53

	Seite
Selektive Transkription fragmentierter <u>M. luteus</u> DNA	57
Charakterisierung der Reaktion	57
Klonierung der Gene für die starken Transkripte	64
Gewinnung der Genbank	64
Identifizierung der Klone	69
<u>In vitro</u> Transkription der klonierten DNA	77
<u>E. coli</u> Promotoren in <u>M. luteus</u> DNA	81
"Shotgun"-Klonierung von hydrolysierter <u>M. luteus</u> DNA	81
Analyse der Klone	83
<u>In vivo</u> Promotoraktivität des Klons mit dem kleinsten Insert	87
Selektion auf <u>in vitro</u> Transkripte mit <u>E. coli</u> Enzym	88
<u>M. luteus</u> Promotoren auf klonierter <u>M. luteus</u> DNA	91
Selektion auf <u>in vitro</u> Transkripte mit <u>M. luteus</u> Enzym	91
<u>In vitro</u> Promotoraktivität des Klons mit dem kleinsten Insert	92
Salzabhängigkeit	94
Sequenzierung des Fragments	96
Lokalisation des Promotors	99
- durch Transkriptlängen	99
- durch Bestimmung des Startnukleotids	103
- durch abortive Initiation	104
- durch Sequenzierung des 5'-Terminus der RNA	107
DISKUSSION	113
ZUSAMMENFASSUNG	121
LITERATURVERZEICHNIS	122

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

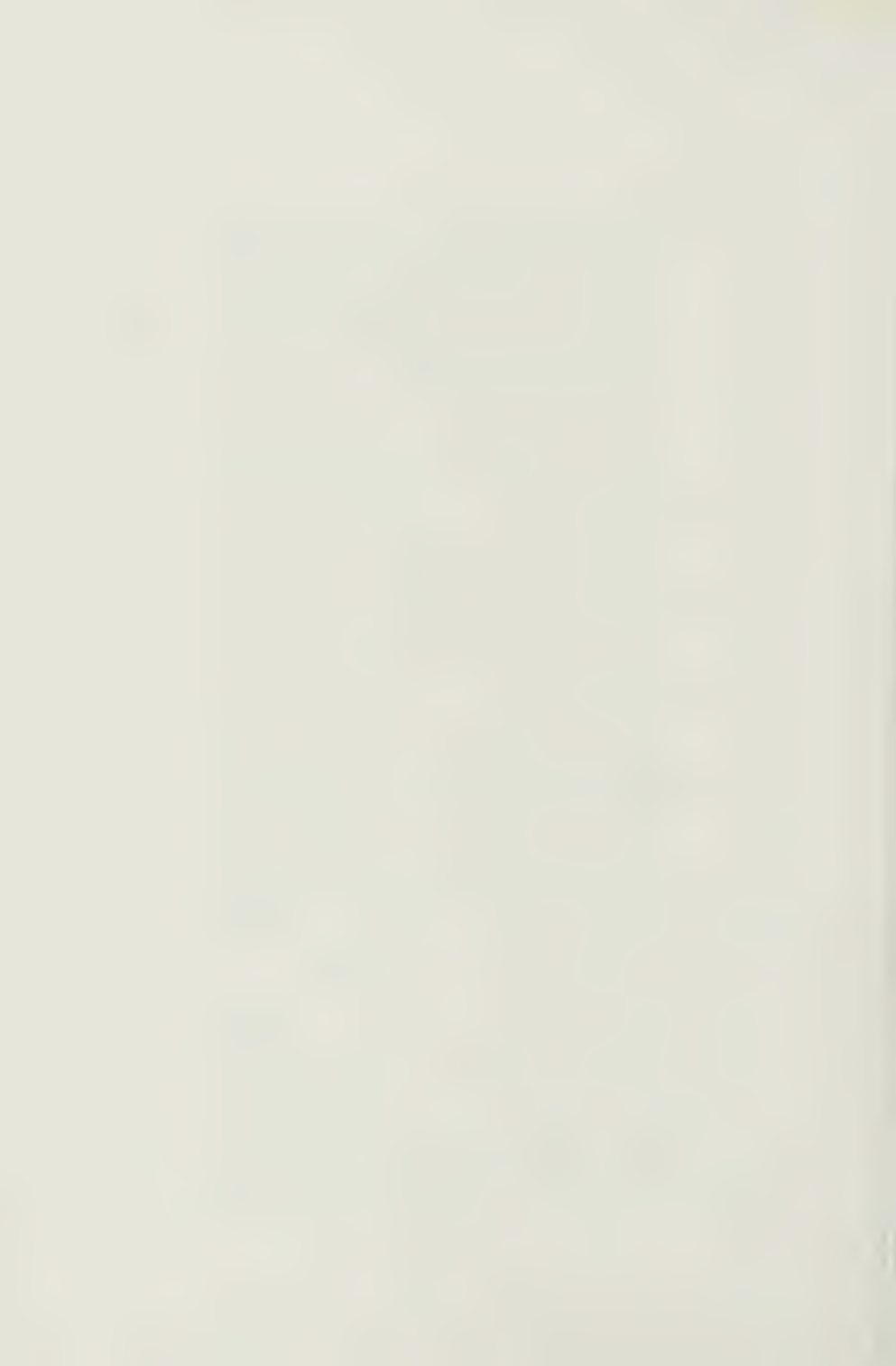
Apr	Ampicillin resistent
Bp	Basenpaare
ddH ₂ O	zweifach-destilliertes Wasser
dda H ₂ O	autoklaviertes dd H ₂ O
dNTPs	3'-Desoxyribonukleosid-triphosphate
ddNTPs	2'-3'-Dideoxyribonukleosid-triphosphat
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia coli</u>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
H4 DNA	Eco R I -Restriktionsfragment aus dem Plasmid pMH4, welches den nativen <u>M. luteus</u> Promotor enthält
H4 RNA	RNA-Transkript an H4 DNA
HP-Enzym	<u>M. luteus</u> RNA Polymerase gereinigt durch Chromatographie an Heparin-Sepharose und Phosphocellulose
kBp	Kilobasenpaare
m _E	Promotor der <u>M. luteus</u> RNA Polymerase im ϕ X174-GenE
<u>M. luteus</u>	<u>Micrococcus luteus</u>
mM	Millimolar
N	Nukleotide
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque-bildende Einheit
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
RNA I	RNA-Transkript, welches bei Position 2977 auf pBR 322 startet und bei Position 105 (109) terminiert
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tcr	Tetracyclin resistent
Tcs	Tetracyclin sensitiv
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer (10mM Tris-HCl pH8,0, 1mM EDTA)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

Verzeichnis der Tabellen und Figuren		Seite
Tab.1	Bestimmung der Promotoraktivität der rekombinanten Plasmide pMH _D 10 und pMH _D 6	36
Tab. 2	Bestimmung der Insertfragmentgrößen rekombinanter vorselektionierter Phagen-DNAs aus der Genbank	72
Tab. 3	Quantifizierung der Syntheseraten des Transkripts A aus Fig. 25 durch die RNA Polymerasen aus <u>M. luteus</u> und <u>E. coli</u>	80
Tab. 4	Bestimmung der Transformationsfrequenzen "shotgun"-klonierter, fragmentierter <u>M. luteus</u> DNA	82
Tab. 5	Ermittlung der Insertfragmentlängen rekombinanter Plasmid-DNAs durch Hydrolyse mit Eco R I	86
Tab. 6	Ermittlung der <u>in vivo</u> Tetracyclin-Resistenzkonzentration des Klons mit dem kleinsten Insert (pMH4)	87
Fig. 1	Strategie der Klonierung des ϕ X174 HaeIII/7 Fragments in pPV33	31
Fig. 2	Koloniehybridisierung der durch Klonierung des Restriktionsfragments ϕ X174 HaeIII/7 erhaltenen Plasmide	34

	Seite
Fig. 3	Analyse der durch Klonierung des Restriktionsfragments ϕ X174 HaeIII/7 erhaltenen Plasmide mit Restriktionsenzymen 34
Fig. 4	Chromatographie von vorgereinigtem <u>M. luteus</u> Zellextrakt an DNA-Cellulose 39
Fig. 5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese von Fraktionen der DNA-Cellulosechromatographie 41
Fig. 6	Chromatographie der aktiven Fraktionen der DNA-Cellulosechromatographie an Biogel A 1,5 m 43
Fig. 7	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese von Fraktionen der Chromatographie an Biogel A 1,5 m 44
Fig. 8	Chromatographie von <u>M. luteus</u> Zellextrakt an Heparin-Sephrose 46
Fig. 9	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese von RNA-Polymerase-Standardenzym und HP-Enzym 48
Fig. 10	Übersichtsdiagramm zur Isolierung von <u>M. luteus</u> RNA Polymerase 49
Fig. 11	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese der RNA Polymerase Fraktionen 1, 3, 9, 10, 11 50
Fig. 12	Analyse der <u>in vitro</u> Transkripte verschiedener <u>M. luteus</u> RNA Polymerase-Präparationen transkribiert an pBR322 54
Fig. 13	Analyse der <u>in vitro</u> Transkripte verschiedener <u>M. luteus</u> RNA Polymerase-Präparationen transkribiert an HaeIII hydrolysierte Lambda-DNA 54
Fig. 14	Transkription Alu I-fragmentierter zellulärer <u>M. luteus</u> DNA in Abhängigkeit von Enzym- und DNA-Konzentration 58
Fig. 15	Bestimmung der Transkriptlängen von Alu I-fragmentierter genomischer <u>M. luteus</u> DNA 58

	Seite
Fig. 16 Hybridisierung von spezifischen <u>M. luteus</u> Transkripten an Alu I -fragmentierter zellulärer <u>M. luteus</u> DNA nach Southern (1975).	62
Fig. 17 Restriktionskarte von λ EMBL3	65
Fig. 18 Bestimmung der Bedingungen für die partielle Hydrolyse von hochmolekularer <u>M. luteus</u> DNA mit Mbo I	68
Fig. 19 Analyse der <u>M. luteus</u> Genbank mit Sal I	68
Fig. 20 Plaquehybridisierung vorselektionierter λ -Klone mit spezifischen <u>M. luteus</u> Transkripten als Probe	70
Fig. 21 Analyse rekombinanter Lambda-DNAs durch Hydrolyse mit Sal I	73
Fig. 22 Hybridisierung von <u>in vitro</u> Transkripten an rekombinante Sal I -hydrolysierte Lambda-DNAs nach Southern (1975)	73
Fig. 23 Gelanalyse des 4 kBp Sal I -Fragments der Klone λ 13 und λ 16 durch Hydrolyse mit Alu I , HaeIII und HpaII	76
Fig. 24 Transkription des klonierten, fragmentierten 4kBp Sal I -Fragments durch <u>M. luteus</u> RNA Polymerase	79
Fig. 25 Vergleichende Transkription des Taq I hydrolysierten 4 kBp Sal I -Fragments durch die RNA Polymerasen aus <u>M. luteus</u> und <u>E. coli</u>	79
Fig. 26 Gelanalyse promotorhaltiger rekombinanter Plasmide durch Hydrolyse mit Eco R I	85
Fig. 27 <u>In vitro</u> Transkription an dem 160 Bp Eco R I -Fragment aus Plasmid pMA3 durch <u>M. luteus</u> und <u>E. coli</u> Enzym	89
Fig. 28 <u>In vitro</u> Transkription an dem 310 Bp Eco R I -Fragment aus Plasmid pMA2 durch <u>M. luteus</u> und <u>E. coli</u> Polymerase	90
Fig. 29 Vergleichende Transkription an dem 380 Bp Eco R I -Fragment aus Plasmid pMA2 und pMA5 mit <u>E. coli</u> und <u>M. luteus</u> Polymerase	93

	Seite
Fig. 30 <u>In vitro</u> RNA-Synthese an dem 230 Bp Eco RI - Fragment aus Plasmid pMH4 (H4 DNA) durch <u>M. luteus</u> und <u>E. coli</u> RNA Polymerase	91
Fig. 31 Abhängigkeit der H4 RNA-Synthese von der im Transkriptionsansatz herrschenden Ionenstärke	95
Fig. 32 Sequenzierung der H4 DNA	98
Fig. 33 Restriktionskarte der H4 DNA	100
Fig. 34 Transkription an die durch Restriktionsenzymver- dauung verkürzte H4 DNA durch <u>M. luteus</u> Polymerase	101
Fig. 35 Längenbestimmung unterschiedlich langer <u>M. luteus</u> Transkripte von H4 DNA	102
Fig. 36. Transkription an Fnu 4 H I hydrolysierter H4 DNA durch <u>M. luteus</u> RNA Polymerase	105
Fig. 37 Ermittlung des Startnukleotids der H4 RNA	105
Fig. 38 Abortive Initiation an H4 DNA durch <u>M. luteus</u> Enzym	106
Fig. 39 Diagramm zur Auswertung eines Fingerprints der "mobility-shift"-Analyse	108
Fig. 40 Sequenzanalyse des 5'-Terminus der H4 RNA durch "mobility-shift"-Analyse	110
Fig. 41 Untersuchung des AT-Gehalts der ersten 50 <u>E. coli</u> Promotoren nach Hawley und McClure (1983)	114
Fig. 42 Vergleich der DNA-Sequenz von <u>M. luteus</u> Promotoren	118



EINLEITUNG

Unser bisheriges Verständnis der Regulation der Transkription basiert zum großen Teil auf Studien der eubakteriellen DNA-abhängigen RNA-Polymerase, die in einer komplexen Reaktion die Umschreibung von DNA in RNA katalysiert. Dieses Enzym, daß am intensivsten an dem gram-negativen Bakterium Escherichia coli untersucht wurde (Losick und Chamberlin, 1976), besteht aus vier Polypeptidketten unterschiedlicher Länge, von denen die beiden größten Untereinheiten β' und β , sowie ein Dimeres der kleinsten Polymeraseuntereinheit α das enzymatisch aktive Coreenzym bilden. Zur korrekten Initiation der RNA-Synthese an einem bestimmten DNA-Bereich, der als Promotor bezeichnet wird, ist die vierte Untereinheit σ notwendig, die zu diesem Zweck mit dem Coreenzym assoziieren muß (Travers und Burgers, 1969). Den selben strukturellen Aufbau zeigen auch RNA Polymerasen aus anderen Bakterien, wie beispielsweise das Enzym aus dem gram-positiven Organismus Micrococcus luteus, welches in unserem Institut isoliert und charakterisiert wurde (Lill et al., 1977; Lill et al., 1975).

Besonders eingehend wurden Promotoren aus E. coli untersucht, die bei diesem Prokaryoten durch zwei im geringen Maß konservierten AT-reichen Hexanukleotidsequenzen vor dem RNA-Startpunkt charakterisiert sind. Auch in Promotoren anderer Organismen, wie etwa Bacillus subtilis oder Salmonella typhimurium, wurden ähnliche Strukturelemente beobachtet (Cowing et al., 1985; Youdrian et al., 1982).

Daß diese Promotorstrukturen jedoch nicht universell sind, zeigen die Transkriptionsinitiationssequenzen der Bakteriophagen T4, T7 und SP01 (Elliott und Geiduscheck, 1984; Jolliffe et al., 1982; Talkington und Pero, 1983). Um an viralen Promotoren initiieren zu können, exprimieren diese Phagen viruscodierte Sigmafaktoren (T4, SP01), oder wie im Fall von T7 eine eigene RNA-Polymerase (Kassavetis und Geiduscheck, 1984; Costanzo und Pero, 1983; Davanloo, 1984).

Es wäre folglich denkbar, daß sich die RNA Polymerasen und deren Promotoren aus unterschiedlichen taxonomischen Gruppen ebenfalls unterscheiden.

Aus einer Arbeit von Ernst et al. (1982) geht hervor, daß die oben angeführten Promotorelemente eine spezifische Nukleotidsequenz, welche im Gen E des Bakteriophagen ϕ x174 gefunden wurde und an der nur M. luteus und nicht E. coli RNA Polymerase selektiv initiiert, nicht ausreichend charakterisieren. Hinweise unterschiedlicher Promotorselektivität wurden auch bei Caulobacter crescentus gefunden, welches ebenso wie M. luteus einen sehr hohen Prozentanteil an GC-Basen in seiner DNA enthält (Winkler et al., 1984; Amemiya et al., 1983).

Von Brack et al. (1984) und (Ernst 1981) wissen wir andererseits, daß die M. luteus RNA-Polymerase auch an E. coli Promotoren initiieren kann. Nichts dagegen ist darüber bekannt, wie natürliche M. luteus Promotoren beschaffen sind und ob sich E. coli und M. luteus RNA Polymerase in der Selektivität der Promotorerkennung an einer GC-reichen Matrize unterscheiden.

PROBLEMSTELLUNG

Es ergab sich damit für diese Arbeit zunächst als Fragestellung zu untersuchen, ob die M. luteus Polymerase eine andere Promotorselektivität an der nativen Matrize besitzt, als das E. coli Enzym. Ferner sollte die Sequenz eines natürlichen M. luteus Promotors aufgeklärt werden. Darüber hinaus galt es festzustellen, ob die in vitro gefundene Selektivität des M. luteus Promotors (Ernst, 1981) auch unter in vivo Bedingungen in E. coli gültig ist.

Weiterhin sollte die M. luteus RNA Polymerase nach verschiedenen Vorschriften isoliert werden. Die Problemstellung bezog sich dabei darauf, ob durch in vitro Transkription der Polymerase-Präparate eine unterschiedliche Promotorselektivität nachweisbar ist.

MATERIAL

Bakterienstämme, Plasmide, Bakteriophagen

Die verwendeten E. coli-Stämme, Plasmide und Bakteriophagen wurden mir freundlicherweise von folgenden Arbeitskreisen zur Verfügung gestellt.

Arbeitskreis Prof. Fanning: E. coli DH1

Arbeitskreis Prof. Hartmann: pBR 322

Arbeitskreis Prof. Schleifer: Micrococcus luteus CCM 169

(Czechoslovakian Collection of Microorganisms, Brno, CSSR)

Arbeitskreis Prof. Winnacker: HB101, JM83, K803, pBR327, pUC8

λ EMBL3A⁺, in vitro Verpackungsmix für Lamda-DNA

Das Promotorselektionsplasmid pPV33 war ein Geschenk von Prof. Rodriguez, Davis, California USA.

Der E. coli-Stamm JM103 war im DNA-Sequenzierungskit der Firma BRL, Maryland, USA enthalten. Der Vektor M13 mp11 war ein Geschenk des Arbeitskreises von Prof. Böck.

Enzyme

Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach; Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu-Isenburg sowie Amersham-Buchler, Braunschweig.

RNA Polymerasen

M. luteus RNA Polymerase

Es wurden verschiedene Enzympräparate verwendet. Die Polymerase-Präparationen wurden von Frau S. Klüpfel-Stahl und FrI. C. Dubler nach Lill et al., (1977) isoliert.

E. coli RNA Polymerase

Das Enzym wurde von Fräulein C. Dubler nach der Vorschrift von Burgess und Jendrisak (1975) angereichert.

Die Enzyme wurden in Lagerungspuffer (10mM Tris-HCL pH7,9; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM KCl, 0,1 mM Dithioerythritol; 60% (v/v) Glycerin) aufbewahrt und vor Gebrauch mit RNA Polymerase-Verdünnungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,9; 0,1 mM Dithioerythritol) auf die geeignete Enzymkonzentration verdünnt.

Eine vergleichbare Aktivitätsbestimmung ist bei den beiden Enzymen nicht möglich, weil nicht bekannt ist, ob sie den gleichen Promotor mit der gleichen Selektivität erkennen.

Weitere Enzyme

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

alkalische Phosphatase; T4-DNA-Ligase, Lysozym; Ribonuklease A;

DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment); Lysozym; Desoxyribonuclease I

E. Merck AG, Darmstadt:

Proteinase K aus Pilzen

New England Biolabs, Schwalbach:

T4-Polynukleotidkinase; T4 DNA-Ligase

Nukleinsäuren und Nukleotide

Amersham und Buchler, Braunschweig:

[α -³⁵S]thiodATP (650Ci/mMol); [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mM);
[α -³²P] CTP (3000 Ci/mMol); [γ -³²P] GTP (10-30 Ci/mMol);
[α -³²P] UTP (400 Ci/mMol); [α -³²P] UTP (3000 Ci/mMol)

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Hefe tRNA; 5S rRNA; Ribonukleosid-5'-triphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP);

BRL GmbH, Neu Isenburg:

M13 Cloning/Dideoxy Sequencingkit (1985)

New England Biolabs, Schwalbach:

Bakteriophagen ϕ X174 RF I DNA; Bakteriophagen ϕ X174/HaeIII-DNA-Längenstandard, Lambda-DNA

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

2', 3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)

Sigma Chemie GmbH, München:

Kalbsthymus-DNA;

Chemikalien, Nährmedien und andere Materialien

O. Aldag, Hamburg:

AZ-Amine

J.T. Baker Chemical Co; Philipsburg, New Jersey, USA:

Cäsiumchlorid

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Chloramphenicol

Bio-Rad Laboratories GmbH, München:

Biogel A 1,5 m

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Yeast-Extract; Bacto-Trypton; Bacto-Agar;

Tryptic-Soy-Broth

Fluka Feinchemikalien, Neu Ulm:

Tris- (Hydroxymethyl)-Aminomethan

Fuji:

Röntgenfilme RX IF

Kodak Limited:

Röntgenfilme X-Omat AR

Merk AG, Darmstadt:

Ammoniumsulfat; Ammoniumperoxysulfat; Ammoniumacetat;

Bromphenolblau; 1-Butanol; Chloroform; Calciumchlorid; Formamid;

Glycerin; Harnstoff; Kaliumchlorid; Methanol; Magnesiumsulfat;

Magnesiumchlorid; Magnesiumacetat; Natriumdesoxycholat;

Natriumacetat; Natriumchlorid; Natriumsulfat; Natriumcarbonat;

Saccharose; Silikonlösung; Trichloressigsäure

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

Heparin-Sepharose Cl 6B

Photo Schaja:

Polaroidfilm Typ 107

Renner GmbH; Dannstadt:

Petrischalen

Schleicher und Schüll, Dassel:

DEAE-Cellulose-Membran, NA-45; Nitrocellulose-Filter, BA-85

Serva, Heidelberg:

Acrylamid; Ampicillin; Coomassie Brilliant Blue G250; Ethanol;
Ethylendiamin-tetraessigsäure; Dialyseschläuche; Natriumdodecyl-
sulfat; Harstoff; 2-Mercaptoethanol; Xylencyanol; Silikonlösung; N, N'-
Methylenbisacrylamid; N, N, N, N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Sigma Chemie, München:

Agarose Typ II; Agarose Typ VII; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
(Tris); 1,4-Dithioerythriol; Ethidiumbromid; Lysozym; Tetracyclin

Vetter GmbH, Wiesloch:

UV-Lampe Chroma 41; 3MM-Chromatographie-Papier; Whatman-
Phosphocellulose P 11

METHODEN

Bakterien und Phagenvermehrung

Bakterienzüchtung

Isolierung von Einzelkolonien

Transformierte E. coli Zellen wurden auf L-Broth Vollmedium-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und etwa 12-18 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die gutschichtbaren Einzelkolonien mit einer sterilen Impfnadel abgepickt und entweder zur weiteren Charakterisierung oder zur Anzucht einer Flüssigkeitskultur verwendet.

Zur Herstellung des Mediums wurden 10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefe-Extrakt, 10g NaCl und 15 g Bacto-Agar in einem Liter destilliertem Wasser autoklaviert, auf 50-60°C abgekühlt, mit sterilem Antibiotikum versetzt, in Plastik-Petrischalen gegossen und kurz abgeflammt. Im Falle von Ampicillin betrug die Endkonzentration 50- oder 100 µg/ml (wobei die höhere Antibiotika-Konzentration bevorzugt verwendet wurde, da diese das Wachstum von Satellitenkolonien unterdrückt) und bei Tetracyclin, wenn nicht anders angegeben, 12,5 µg/ml. Nach dem Erstarren des Mediums wurden die Agarplatten für 10 Minuten in einer sterilen Werkbank getrocknet, sodann in Aluminiumfolie verpackt und bei 4°C für maximal 3 Wochen aufbewahrt.

Im Falle von M. luteus Zellen bestand das Medium, welches kein Antibiotikum enthielt, aus: 10g Pepton, 5g Glucose, 5g Hefe-Extrakt, 8g NaCl und 15g Bacto-Agar pro Liter (pH 7,2).

Aufzucht in Flüssigkultur

Ein Liter sterilisiertes L-Broth Vollmedium (10g Bactotrypton, 5g Bacto-Hefe-Extrakt und 10 g NaCl pro Liter) wurde je nach Bedarf mit sterilem Antibiotikum (Endkonzentration: 50 - 100 µg/ml Ampicillin, 12,5 µg/ml Tetracyclin) versetzt, mit 20-50 ml einer Bakterien-Übernachtskultur versetzt und bei 37°C im Bakterienrührer geschüttelt. Bei einer optischen Dichte von 0,8 - 1,0 nm gemessen, bei einer Wellenlänge von 580 nm, wurden plasmidhaltige *E. coli* Zellen durch Zugabe von Chloramphenicol (Endkonzentration, 170 µg/ml) in ihrer Plasmidsyntheserate stimuliert und anschließend über Nacht weitergeschüttelt. Die Bakterien wurden am nächsten Tag durch Zentrifugation geerntet und weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Die *E. coli*-Stämme HB101, JM83 wurden für die DNA-Transformation kompetent gemacht, wie bei Maniatis et al. (1982) auf Seite 250 beschrieben.

Transformationskompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DH1 wurden nach folgender Methode hergestellt:

Fünf Milliliter ψ a-Medium [5g Hefe-Extrakt, 20g Trypton, 5g MgSO₄ pro Liter, pH7,6 (mit KOH eingestellt)] wurden mit einer frischen Einzelkolonie angeimpft, etwa zwei Stunden bei 37°C geschüttelt und nach Erreichen der Zelldichte von A₅₅₀ = 0,3 mit 95 ml 37°C warmen ψ a-Medium verdünnt. Die Bakterien suspension wurde für etwa zwei Stunden bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,48, gemessen bei 550, nm weitergeschüttelt, anschließend fünf Minuten im Eiswasser abgekühlt und fünf Minuten bei 6000 Upm in einem Sorvall SS34-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde in 40 ml sterilfiltriertem Tfb I-Medium (30mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl,

10mM CaCl_2 , 50mM MnCl_2 , 15% (v/v) Glycerin, pH5,8; (mit 0,2 M Essigsäure eingestellt)) suspendiert, 5 Minuten im Eiswasser inkubiert und anschließend zentrifugiert, wie oben beschrieben. Sodann wurde der Bakterienniederschlag in 4 ml sterilfiltriertem TfbII-Medium (10 mM MOPS; 75mM CaCl_2 10 mM RbCl , 15% (v/v) Glycerin, pH 6,5; eingestellt mit KOH) aufgenommen, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in Aliquots von 0,2 ml bei -80°C eingefroren.

Herstellung transformationskompetenter E. coli JM103 Zellen

Eine frische Übernachtskultur in YT-Medium (Pro Liter: 8g Bactotrypton, 5g Bacto Hefeextrakt und 5 g NaCl) wurde 1:1000 mit YT-Medium verdünnt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis die Suspension eine optische Dichte von 0,3 - 0,4, gemessen bei 660 nm, erreicht hatte. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (7000 g, 5 Minuten) vom Nährmedium befreit und in 50 % des vorherigen Volumens in kalter steriler CaCl_2 -Lösung (50mM CaCl_2) aufgenommen. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (7000 g, 5 Minuten) und in einem Zehntel des Ausgangsvolumens an kalter, steriler 50 mM CaCl_2 -Lösung suspendiert. Die Zellen wurden am selben Tag für die Transformation verwendet.

Transformation von Bakterien

Die kompetenten E. coli Bakterienstämme HB101 und JM83 wurden transformiert, wie bei Maniatis et al. (1982) auf Seite 250 beschrieben.

Transformation von DH1-Zellen:

200µl tiefgefrorene, kompetente Bakterien wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, 10 Minuten in Eis inkubiert und mit 10-100 ng ligierter DNA, die in einem Gesamtvolumen von 10 - 40 µl gelöst war, versetzt und für 45 Minuten im Eis inkubiert. Nach einem 1,5minütigen

Hitzeschritt bei 42°C für 1-2 Minuten wurde 0,8 ml ψ a-Medium (pro Liter: 5g Hefe-Extrakt, 20 g Trypton, 5g $MgSO_4$, pH7,6; (mit KOH eingestellt)) zu der Bakteriensuspension gegeben. Die Bakterien wurden sodann bei 37°C für eine Stunde leicht geschüttelt, anschließend auf L-Broth Agarplatten, die 100 μ g/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Transformation von JM103-Zellen

5 μ l (etwa 2ng) M13 mp11 RF-DNA wurden mit 0,3 ml kompetenter Zellen versetzt und für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 Minuten, 42°C) wurde zu der Bakteriensuspension 10 μ l 100 mM ITPG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid), 50 μ l 2% X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid), 0,2 ml JM103-Zellen (in exponentiellem Wachstum) und 3 ml Weich-Agar gegeben, gemischt und sofort auf YT-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht standen die weißen rekombinanten Plaques für die DNA-Einzelstrangisolierung zur Verfügung.

Weichagar: 6g Bacto-Agar in einem Liter YT-Medium
(Der Weichagar wurde nach dem Autoklavieren auf etwa 50°C abgekühlt und im flüssigen Zustand verwendet)

YT-Agarplatten: 15 g Bactoagar in pro Liter YT-Medium

YT-Medium: 8g Bactotrypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 5 g NaCl,
1000 ml Wasser

Phagenvermehrung

Züchtung von E. coli K803 Zellen für die Lambda-Vermehrung

100ml einer Übernachtskultur wurden bei 4000 g für etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde sodann in 25ml sterilen SM-Puffer (5,8g NaCl, 2g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 50 ml 1M Tris-HCl (pH7,5), 1% Gelatine, 950 ml H_2O dest.) aufgenommen und für höchstens drei Wochen bei 4°C aufbewahrt.

Vermehrung des Bakteriophagen Lambda

Die Bakteriophagen wurden in einer Flüssigkultur von E. coli-Zellen des Stammes K803 in NZCYM-Medium gezüchtet, wie bei Maniatis et al. (1982) auf Seite 77, 80 beschrieben und über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt (Maniatis et al., 1982; Seite 84). Zur Infektion wurden pro Liter NZCYM-Medium $2 \cdot 10^{10}$ E. coli K803 Zellen mit 10^8 pfu einer Phagenstocklösung versetzt, welche, wie bei Maniatis et al., (1982) auf Seite 65 beschrieben, hergestellt worden war.

In vitro Verpackung von Lambda-DNA

Die zur Verpackung der DNA notwendigen E. coli Lysate SE und FTL wurden mir freundlicherweise von Herrn P. Hartl (Institut für Biochemie der Universität München) zur Verfügung gestellt. Sie wurden wie bei Hartl (1984) beschrieben hergestellt.

Nach dem Auftauen der Lysate auf Eis wurden zu 10µl FTL-Extrakt maximal 1 µg DNA in einem Volumen von 2 µl zugegeben und mittels

Pipettenspitze vorsichtig durchmischt. Nach Zugabe von 15 µl SE-Lysat zu der Mischung wurde der Verpackungs-Mix für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die verpackte Phagen-DNA konnte nach dieser Zeitspanne wie eine Phagenstocklösung behandelt werden. Zur Titerbestimmung (Maniatis et. al., 1982; Seite 64) wurde die Phagensuspension mit SM-Puffer geeignet verdünnt.

Isolierung von DNA

Isolierung von zellulärer DNA aus *M. luteus*

Mit einer frischen Einzelkolonie von *M. luteus*-Zellen wurden 500 ml steriles Nährmedium (10g Pepton, 5g Glucose, 5g Hefe-Extrakt, 8g NaCl pro Liter (pH7,2)) angeimpft und unter heftigem Schütteln in einem Bakterienschüttler bei 37°C für 24-32h inkubiert. Die Bakterien wurden durch 10minutige Zentrifugation in einen Sorvall-GS3-Rotor bei 6000 Upm gesammelt, vom Überstand befreit und in 50 ml NaCl-Lösung (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA pH8,0) aufgenommen. Die tiefgelbe Bakteriensuspension wurde sodann mit 25 ml Lysozymlösung (1,5 mg/ml Lysozym in 0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA pH8,0) versetzt und für eine Stunde unter gelegentlichem Schwenken in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 5ml einer 10%igen Natriumdodecylsulfat-Lösung und 1,7 ml Proteinase K-Lösung (10mg/ml in ddH₂O) und anschließender Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Bakteriensuspension bei 65°C für 45 Minuten inkubiert. Nach Phenolextraktion (3x) und Chloroformextraktion (3x), welche wie bei Maniatis et. al. (1982) beschrieben durchgeführt wurde, wurde nach Zugabe von 1/9 Volumen 3 M Na-Acetat zur Lösung diese mit demselben Volumen an -20°C kaltem Isopropanol vorsichtig überschichtet. Die an der Phasengrenze als weiße fädige, Struktur ausfallende DNA wurde auf einem mit Schleifpapier aufgerauhtem Glasstab aufgewickelt, kurz an der Luft getrocknet, in etwa 50ml 70%

Ethanol gewaschen und anschließend im Exsikkator für 10 - 15 Minuten getrocknet. Die DNA wurde sodann durch vorsichtiges Drehen des Glasstabes in einem geeignetem Volumen TE-Puffer (10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH8,0)) gelöst. Anschließend wurde die DNA-Lösung durch CsCl-Gradientenzentrifugation (Maniatis et. al., 1982; Seite 93) in einem Beckman Vertikalrotor (VTi 65) für 18 Stunden bei 47000 Upm (20°C) gereinigt und nach Entfernung des Ethidiumbromids durch fünffache Extraktion mit 1-Butanol gegen ein 1000faches Volumen TE-Puffer dialysiert. Die DNA-Konzentration wurde durch Messen der Extinktion bei 260 nm ermittelt, die Reinheit der DNA-Präparation konnte durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden.

Isolierung von Lambda-DNA

Aus den durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigten Phagenpartikeln wurde die DNA isoliert, wie bei Maniatis et. al. (1982) auf Seite 85 beschrieben.

Isolierung von Plasmid-DNA

In den meisten Fällen wurde die Plasmid-DNA über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation nach der "clear-lysate"-Methode gereinigt, wie bei Brack (1983) ausführlich beschrieben.

Jedoch wurden die E. coli Zellen nicht in M9-Medium, sondern in L-Broth-Medium (mit geeignetem Antibiotikum) und ohne Uridinzugabe gezüchtet. Zur Entfernung zellulärer Partikel nach der Lysozymbehandlung wurde das Bakterienlysat in einem Sorvall SS34-Rotor bei 4°C und 20 000 Upm eine Stunde zentrifugiert. Die Dialyse der Plasmid-DNA nach Entfernung des Ethidiumbromids mit 1-Butanol (Maniatis et al., 1982) erfolgte mehrmals gegen ein 1 000-faches Volumen an TE-Puffer bei 4°C. Die DNA wurde bei -20°C in Portionen zu 0,5 ml aufbewahrt.

In einigen Fällen wurde die "clear-lysate"-Methode durch die alkalische Extraktionsmethode (Birnboim, 1983) ersetzt. Dieses Verfahren erwies sich jedoch als zu teuer und zu zeitintensiv.

Isolierung von einzelsträngiger M13-Phagen-DNA

Bakteriophagen aus einem weißen Phagenplaque wurden in 1ml YT-Medium suspendiert und nach Zugabe von 10µl exponentiell wachsender JM 103 Zellen bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge wurden 0,8 ml Überstand mit 200 µl PEG-Lösung (20% PEG 6000, 2,5 M NaCl) versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierten Phagen wurden durch Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge (5 Minuten, 10 000 Upm) vom Überstand befreit. Nach vorsichtigem Abwischen der Innenwand des Eppendorf-Reaktionsgefäßes mit einem Saugpapier, wurde der Phagenniederschlag in 100 µl TES-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM NaCl, 0,1 ml EDTA) aufgenommen und durch zweiminütiges "Vortexen" suspendiert. Nach zweimaliger Phenol-Extraktion konnte die Phagen-DNA durch Ethanolfällung gesammelt werden. Die DNA wurde in TE-Puffer bei -20°C aufbewahrt.

YT-Medium: 8g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 5g NaCl, 1 000 ml Wasser

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurden mehrere Verfahren benutzt.

Die von Langridge et. al. (1980) entwickelte Methode zur Extraktion von DNA aus niedrigschmelzender Agarose wurde durch das wesentlich schnellere Verfahren von Weislander et al. (1979) ersetzt, wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben. Sollten geringe Mengen an DNA aus Agarosegelen mit normalem Schmelzpunkt isoliert werden, wurde nach der Methode von Winberg und Hammarskjöld (1980) gearbeitet, jedoch wurde anstatt DEAE-Cellulose-Papier, DEAE-Cellulose-Membran (Schleicher und Schüll, NA-45) verwendet.

Wurden größere DNA-Mengen, wie sie zur Erstellung einer Genbank oder zur in vitro Transkription notwendig sind, benötigt, erfolgte die Isolierung der DNA durch Elektroelution in einen Dialysesack (Maniatis, et al. 1982; Seite 164)

Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen

Zur Isolierung von DNAs aus Polyacrylamidgelen wurde ausschließlich die Methode von Maxam und Gilbert (1977), wie auf der Seite 178 in Maniatis et. al. (1982) beschrieben, verwendet.

Reinigung und Konzentrierung von DNA und RNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren erfolgte wie bei Maniatis et. al. (1982) auf Seite 458 und 461 beschrieben. Zur DNA-Fällung wurden 2,5 Volumen und zur RNA-Fällung drei Volumen Ethanol verwendet.

Enzymatische Reaktionen an DNA

Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Fragmentierung der DNA wurden DNA-Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,25 mg/ml eingesetzt und mit entsprechenden fünffach oder zehnfach konzentrierten Puffer auf die benötigten Salzbedingungen eingestellt.

Für oft verwendete Restriktionsenzyme wie Eco RI, Bam HI, Sal I, Sma I, Hae III, Taq I, Hinf I, wurden die von den Herstellern empfohlenen Puffer, jedoch ohne Rinderserumalbumin, verwendet. 2-Mercaptoethanol wurde durch die entsprechende Konzentration an Dithiotreitol ersetzt. Die übrigen Enzymreaktionen wurden gemäß der Einteilung von Maniatis *et al.* (1982) in Puffern von niedriger, mittlerer und hoher Ionenstärke durchgeführt. Für die DNA-Hydrolyse bei der angegebenen Temperatur wurden pro μg DNA 1-5 Enzymeinheiten eingesetzt. Ein Enzymüberschuß war teilweise notwendig, da die von den Herstellern der Restriktionsenzyme angegebenen Aktivitäten manchmal variierten, und zudem zur Spaltung superhelikaler DNAs mehr Enzymaktivität benötigt wird, als zur Spaltung derselben Menge linearisierter DNA. Die Inkubationszeit betrug zwischen einer und mehreren Stunden. DNase-Aktivitäten wurden selbst bei Inkubation über Nacht nicht beobachtet. Die Reaktion wurde entweder durch Phenolisieren beendet oder durch Zugabe von 0,6 - 1 Volumen sechsfachkonzentriertem Gelauftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 60 mM EDTA, 15% Ficoll (Typ 400 in ddH_2O) für die Gelelektrophorese vorbereitet.

Hydrolyse von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) und mit der entsprechenden Menge an alkalischer Phosphatase (2 Enzymeinheiten pro μg DNA) versetzt und für 60 Minuten bei 37°C

inkubiert. Nach Denaturierung des Enzyms durch 30minutige Inkubation bei 65°C wurde das Protein durch Phenolextraktion entfernt und die DNA durch Zugabe von Ethanol gefällt.

³²P-Markierung von DNA-Fragmenten mit T4-Polynukleotid-Kinase

Die Reaktion in Anwesenheit von 50 - 100 µCi [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol) wurde nach der Vorschrift von Maniatis et. al. (1982) Seite 122 durchgeführt.

Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Enzym

Die DNA (1µg) wurde in Anwesenheit von 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, 0,1mM DTT, 0,1 mM dNTPs (d ATP, dCTP, dGTP, dTTP) und einer Enzymeinheit Klenow-Fragment bei 22°C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 65°C beendet.

Kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase

Die Ligasereaktionen wurden meist in einem Volumen von 10-20 µl ausgeführt. Die Lösung enthielt 50 mM Tris-HCl (pH7,4), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP und 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin. Meist wurden von der Vektor-DNA 0,2-2 µg eingesetzt, die Konzentration der zur vermehrenden DNA wurde in den meisten Fällen nach Dugaiczky et. al. (1975) berechnet. Die Inkubationsdauer mit mehreren Enzymeinheiten T4-Ligase bei 14 - 16°C betrug 8 bis 24 Stunden.

DNA-Sequenzierung an einzelsträngiger DNA nach dem Didesoxyverfahren

Zu 5 μ l (etwa 0,5 μ g) einzelsträngiger Phagen-DNA wurden 2 μ l Primer-DNA (5 ng, 17mer-Primer) sowie 1 μ l Polymerase-Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 12,5 μ l gegeben. Nach 5minutiger Inkubation bei 90°C und 45minutiger Inkubation bei 65°C wurde die Lösung langsam im Wasserbad (65°C) auf Raumtemperatur abgekühlt und durch Zentrifugation gesammelt. Zu der gepimten DNA-Lösung wurden 1 μ l 0,1 M DTT-Lösung, 1 μ l Klenow-Fragment (2-5 Enzymeinheiten) und 20 μ Ci (1-2 μ l) wässriges Desoxyadenosin-5'- [α -³⁵S-]thiotriphosphat (650 Ci/m Mol) gegeben, durchmischt und in 3 μ l Portionen zu jeweils 2 μ l "A, C, G und T-Mix" gegeben. Nach 20minutiger Inkubation bei 22°C wurde zu jedem Ansatz 1 μ l 0,5 mM dATP-Lösung gegeben und für weitere 20 Minuten bei 22°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l Gelauftragungspuffer und Erhitzen der Lösung auf 100°C für zwei bis fünf Minuten beendet. Danach wurde ein Aliquot, der in Eiswasser abgeschreckten Proben auf ein auf 65°C vorgewärmtes Sequenzgel aufgetragen und der Rest bei -20°C gelagert.

"A-Mix": 1 μ l A°-Mix und 1 μ l ddATP (1,0 mM)

A°-Mix: 20 μ l 0,5 mM dTTP

20 μ l 0,5 mM dCTP

20 μ l 0,5 mM dGTP

20 μ l Polymerase-Reaktionspuffer

"C-Mix": 1 μ l C^o-Mix und 1 μ l ddCTP (0,35 mM)

C^o-Mix: 20 μ l 0,5 mM dTTP

1 μ l 0,5 mM dCTP

20 μ l 0,5 mM dGTP

20 μ l Polymerase-Reaktionspuffer

"G-Mix": 1 μ l G^o-Mix und 1 μ l ddGTP (0,7 mM)

G^o-Mix: 20 μ l 0,5 mM dTTP

20 μ l 0,5 mM dCTP

1 μ l 0,5 mM dGTP

20 μ l Polymerase-Reaktionspuffer

"T-Mix": 1 μ l T^o-Mix und 1 μ l ddTTP (2 mM)

T^o-Mix: 1 μ l 0,5 mM dTTP

20 μ l 0,5 mM dCTP

20 μ l 0,5 mM dGTP

20 μ l Polymerase-Reaktionspuffer

(Der "A, C, G und T-Mix" wurde maximal zwei Wochen bei -20°C aufbewahrt.)

Polymerase-Reaktionspuffer: 70 mM Tris-HCl (pH 7,5)

70 mM MgCl₂

500 mM NaCl

Gelauftragspuffer: 0,1 % (w/v) Xylencyanol

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

10 mM EDTA

95% (v/v) deionisiertes Formamid

17-mer Primer: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

(bekam ich von Herrn P. Heinrich, Institut für Biochemie der Universität München).

Identifizierung rekombinanter DNA

Schnelle Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA

Rekombinante Plasmide wurden durch die Methode der alkalischen Zellyse isoliert (Birnboim, 1983; Maniatis et al., 1982), wenn die Plasmid-DNA durch Restriktionsenzym-Analyse weiter untersucht werden sollte. Bei diesen beiden sehr ähnlichen Verfahren ist für eine erfolgreiche Enzymverdauung die quantitative Entfernung des Nährmediums von großer Bedeutung, da dieses Restriktionsenzyme inhibiert.

Sollten Plasmide nur auf das Vorhandensein von Insert-DNA untersucht werden (rekombinante Plasmide haben eine geringere Mobilität in der Gelelektrophorese als die Vektor-DNA), wurde die Methode der Kolonie-Lyse verwendet (Maniatis et al., 1982; Seite 370).

Schnelle Isolierung von Lambda-DNA

Zur Isolierung von Lambda-DNA wurde die Platten-Lysat-Methode verwendet, wie bei Maniatis et al. (1982) auf Seite 371 beschrieben.

In situ Hybridisierung von Bakterienkolonien

Um schnell eine große Anzahl von Klonen auf den Einbau von rekombinanter DNA testen zu können, wurde die Technik der Kolonie-

Hybridisierung gewählt (Grundstein und Hogness, 1985). Dazu wurde vorgegangen wie im Manual von Maniatis et al. (1982) auf Seite 313 und 315 beschrieben. Nach dem Einbacken des Filters bei 80°C wurde dieser auf Haushaltsfolie gelegt und von unten mit etwa 2ml Hybridisierungsflüssigkeit (in vitro synthetisierte, radioaktivmarkierte RNA in 50% Formamid und 5x SSC-Puffer) benetzt. Der Filter wurde anschließend mit der restlichen Hybridisierungsflüssigkeit im Plastikbeutel verschweißt und bei 42°C unter Schütteln mindestens 48 Stunden inkubiert.

Der Filter wurde nach der Hybridisierung zweimal bei Raumtemperatur in 50 ml 2 x SSC-Puffer gespült und anschließend in 50 ml 2 x SSC-Puffer, welcher 20 µg/ml hitzebehandelte RNase A enthielt, bei 25°C eine Stunde inkubiert. Nach Trocknen des Filters an der Luft wurde dieser für die Autoradiographie verwendet.

(20 x SSC-Puffer: 175,3 g NaCl, 88,2g Natriumcitrat pro Liter, pH 7,0)

In situ Hybridisierung von Bakteriophagen-Plaques

Zur Hybridisierung der M. luteus Lambda-Genbank wurde das Verfahren von Benton und Davis (1977) verwendet. Dabei wurde vorgegangen, wie in Legende zu Figur 20, im Text und bei Maniatis et al. (1982) auf Seite 320 - 321 beschrieben.

Southernblot-Hybridisierung

Die Southern-Analyse wurde durchgeführt wie in den Legenden zu Figur 16 und 22 beschrieben.

Anreicherung der RNA Polymerase aus *M. luteus*

Die Vorschriften für die Isolierung der *M. luteus* RNA Polymerase wurden in die jeweiligen Legenden der entsprechenden Figuren aufgenommen. Der Aktivitätstest der Säulenfraktionen wurde mit [α - 32 P]UTP, mit den in meiner Diplomarbeit beschriebenen Salzkonzentrationen (Mangan wurde nie verwendet), durchgeführt.

Enzymatische Reaktion mit RNA Polymerase

In vitro RNA-Synthese unter Standardbedingungen

Der Transkriptionsansatz enthielt, wenn nicht anders angegeben in, 50 μ l Gesamtvolumen:

50 mM Tris-HCl (pH 7,9)
0,1 mM Dithioerythritol
10 mM $MgCl_2$
200 mM KCl
0,6 mM ATP
0,6 mM GTP
0,6 mM CTP
0,16 mM UTP
10 μ Ci [α - 32 P] UTP (400 Ci/mmol)
0,1 μ g DNA-Fragment
6,2 μ g RNA Polymerase

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms und Temperaturerhöhung von 0°C auf 37°C gestartet. Nach 60minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe desselben Volumens an Stopplösung (50 mM EDTA, 200 μ g/ml tRNA, 0,4

mg/ml Proteinase K) und weitere Inkubation für 30 Minuten bei 37°C beendet. Die radioaktive RNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH5,2) und 3 Volumen Ethanol von -20°C über Nacht bei -20°C gefällt. Die RNA wurde durch 15minütiges Zentrifugieren gesammelt, im Exsikkator kurz getrocknet und in 20 - 50 µl Proben-auftragspuffer aufgenommen.

Probenauftragspuffer: 0,1% (w/v) Xylencyanol
 0,1% (w/v) Bromphenolblau
 10 mM EDTA
 95% Formamid

Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die RNA durch 5minütige Inkubation bei 100°C denaturiert und in Eiswasser abgeschreckt.

Synthese von γ -³²P-markierter RNA

Der Transkriptionsansatz enthält folgende Komponenten in einem Gesamtvolumen von 0,125 ml:

50 mM Tris-HCl (pH7,9)
0,1 mM Dithioerythritol
10 mM MgCl₂
200 mM KCl
0,16 mM ATP
0,6 mM CTP
0,6 mM GTP
0,6 mM UTP
200 µCi [γ -³²P] ATP (3300 Ci/mmol)
0,5 g DNA-Fragment
62 µg RNA Polymerase

Die Reaktion wurde, wie zuvor beschrieben gestartet. Nach Inkubation der Transkriptionslösung bei 37°C für zwei Stunden wurde die Reaktion beendet und die RNA nach je zweimaligem Waschen mit 75% Ethanol und 95 % Ethanol für die Elektrophorese in einem denaturierenden

Polyacrylamidgel vorbereitet (vergl. in vitro RNA-Synthese unter Standardbedingungen, sowie Kapitel Gelelektrophoresen).

Die durch Autoradiographie lokalisierte RNA wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Elution der RNA aus dem Gelstück wurde dieses im gefrorenen Zustand (-70°C) mit einem Glasstab zerrieben, mit 0,3 ml Elutionslösung (0,5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 0,2% Natriumdodecylsulfat, 0,1 mM EDTA) und 50 µg tRNA versetzt und bei 37°C im Bakterienschüttler etwa zwei Stunden geschüttelt. Die eluierte RNA wurde durch 10minütiges Zentrifugieren von den Gelteilchen, befreit mit Ethanol gefällt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit kaltem 75% Ethanol vorsichtig gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 10 µl dda H₂O aufgenommen.

Nukleotid-Sequenz-Analyse des 5'-Terminus von RNA nach der "mobility-shift" Methode

Die Sequenzierung der RNA wurde zusammen mit Herrn Dr. H. Domdey am Genzentrum der Universität München durchgeführt.

Die am 5'-Ende markierte RNA wurde in Anwesenheit von 1µg Carrier-tRNA für 10 Minuten in 10µl 50 mM NaHCO₃ (pH9,1), 0,5 mM EDTA gekocht, mit 0,1 N HCl neutralisiert (Kikuchi et al., 1982) und anschließend durch Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen bei pH 3,5 und Homochromatographie auf DEAE-Cellulose in 10 mM Homomix (Silberklang et al. 1979) aufgetrennt. Nach Autoradiographie wurde das Oligonukleotidmuster nach Wu und Tu (1980) ausgewertet.

Gelelektrophoresen

Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Identifizierung und zur Auftrennung von DNA-Molekülen für analytische und präparative Zwecke wurden horizontale Agarosegele verschiedener Konzentration (0,4 - 1,8 % Agarose) und Dimension gegossen. Als Elektrolyt wurde TBE-Puffer (0,089 M Tris-Borat, 0,089 M Borsäure, 0,002 M EDTA) benützt. Ansonsten wurde die Agarosegelelektrophorese durchgeführt, wie in Maniatis et al. (1982) ausführlich beschrieben. Zur Dokumentation der mit Ethidiumbromid angefärbten DNA im Gel wurde diese auf einer UV-Lampe (254 nm) mit einer Polaroidkamera mit Rotfilter auf Polaroidfilm photographiert.

Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

DNA Fragmente zwischen 120 und 1 300 Basenpaaren Länge wurden in einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Maniatis et al., 1982, Seite 173 - 177). Die Dokumentation der Gele erfolgte wie oben beschrieben.

Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Gelelektrophorese von Proteinen in Plattengelen mit einer Trenngellänge von etwa 10 cm wurde wie bei Rauscher (1982) beschrieben, durchgeführt.

Denaturierendes Polyacrylamidgel für RNAs

Die Auftrennung von in vitro Transkripten erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in einem 4%igen denaturierenden Polyacrylamid-Sequenzgel.

200 ml Gellösung enthielten:

7,6 g Acrylamid

0,4 g N, N'-Methylenbisacrylamid

96 g Harnstoff

20 ml 10 x TBE - Puffer

0,12 ml N, N, N', N'-Tetramethylmethyldiamin (TEMED)

50 µl Ammoniumperoxodisulfat (50% (w/v) in ddH₂O)

Die Lösung wurde vor Zugabe von TEMED und Ammoniumperoxodisulfat entgast. In den meisten Fällen wurde zum Abdichten der Gelkammer ein sehr schnell polymerisierendes Stützgel gegossen. Dazu wurden von der Gellösung (ohne TEMED und Ammoniumperoxodisulfat) 20 ml entnommen und mit 32 µl TEMED und 20 µl Ammoniumperoxodisulfat (50% (w/v)) versetzt. Vor der Elektrophorese wurden die Geltaschen vorsichtig mit ddH₂O ausgespült. Zur Entfernung von Ammoniumperoxodisulfat aus dem Gel, wurde vor dem Auftragen der Proben für 30-60 Minuten eine Vorelektrophorese (5V/cm) durchgeführt. Die Spannung während der Elektrophorese in TBE-Puffer bei Raumtemperatur betrug üblicherweise 8-10 V pro cm Gellänge. Anschließend wurde das Gel mit einer Haushaltsfolie bedeckt und zur Sichtbarmachung der RNAs eine Autoradiographie bei Raumtemperatur angefertigt.

(TBE-Puffer: 0,089 M Tris-Borat; 0,089 M Borsäure; 0,002 M EDTA)

Denaturierendes Polyacrylamidgel zur DNA-Sequenzierung

Zur Auftrennung denaturierter DNAs wurden üblicherweise 6-8%ige hochauflösende Polyacrylamidgele (55 cm x 21 cm x 0,01 cm) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer Makrophor-Apparatur der Firma LKB durchgeführt.

75 ml entgaste Lösung für ein 8%iges Polyacrylamidgel enthielten:

15 ml 40%iges Acrylamid /Bisacrylamid (38% Acrylamid/2 %

N,N'-Methylenbisacrylamid in ddH₂O)

36 g Harnstoff

7,5 ml 10 x TBE-Puffer

0,45 ml 10%iges (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

0,02 ml TEMED

Vor dem Gießen des Gels wurden die Glasplatten vorbehandelt:

Ohrenglasplatte: 182 µl Bindsilan [γ-(Metacryloxi)-Propyltrimethoxysilan; Sigma], 187 µl 10%ige Essigsäure und 5 ml Ethanol wurden auf der Glasplatte verteilt. Nach dem Trocknen (etwa 5 Minuten) und Polieren, wurde die Glasplatte mit 5 ml Ethanol nachgewaschen und erneut poliert.

Heizplatte: 5 ml Silikonlösung (Serva) wurden auf der Platte verteilt und nach dem Trocknen für 5 Minuten intensiv poliert. Nach Wiederholung dieses Vorgangs und anschließender Ethanolbehandlung (siehe oben) konnten die Glasplatten in diesem Zustand bei Raumtemperatur aufbewahrt oder sofort verwendet werden.

Nach Beendigung der Polymerisation wurden die Geltaschen intensiv mit Elektrophoresepuffer (TBE-Puffer) gespült. Zur Entfernung des Ammoniumperoxodisulfats aus der Gelmatrix wurde vor dem Auftrennen der Proben bei 65°C (2 500 - 3 000 V, 20 - 25 mA) eine 30 minutige Vorelektrophorese bei 2 500 V Spannung durchgeführt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das an der Ohrenglasplatte haftende Gel unter Schwenken für 15 - 30 Minuten in zwei Litern 10%iger Essigsäure zur Entfernung des Harnstoffs gebadet, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und für ein bis zwei Stunden bei 80°C im Trockenschrank getrocknet. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde eine Autoradiographie angefertigt. Die Expositionszeit bei -70°C betrug zwei bis vier Tage.

(TBE-Puffer: 0,089 Tris-Borat, 0,089 Borsäure, 0,002 M EDTA)

ERGEBNISSE

In vivo Spezifität des *M. luteus* Promotors

Klonierung in pPV33

Um die Frage experimentell untersuchen zu können, ob der spezifische *M. luteus* Promotor m_E (Ernst, 1981) auch unter in vivo Bedingungen inaktiv mit *E. coli* RNA Polymerase ist, wurde das den m_E -Promotor tragende Restriktionsfragment $\phi X174$ HaeIII/7 in einen für diese Fragestellung konstruierten Vektor eingebaut. Hierzu wählte ich pPV33 (West und Rodriguez, 1982), ein Plasmidderivat von pBR327 (Soberon et. al., 1980) dessen Tetracyclin-Promotor durch Exonuclease III - und Bal 31-Behandlung deletiert worden war. Ein weiteres Merkmal von pPV33 sind drei nicht-in-Phase befindliche Stop-Codons zwischen der Eco RI - Klonierungsstelle und dem Initiationscodon für das Tetracyclingen. Dadurch wird die Entstehung von Fusionsproteinen verhindert. Befindet sich in der Eco RI -Stelle von pPV33 ein Promotor für das *E. coli* Enzym in der richtigen Orientierung, so sollte sich in vivo eine phänotypisch meßbare Tetracyclin-Resistenz zeigen.

$\phi X174$ RF DNA wurde vollständig mit dem Restriktionsenzym HaeIII verdaut und aus dem DNA-Gemisch ein 234 Bp großes Fragment, das den spezifischen *M. luteus* Promotor enthielt, durch Gelelektrophorese isoliert. Der Vektor pPV33 wurde durch Eco RI -Verdauung linearisiert und seine 5'-überhängenden DNA-Enden in Anwesenheit von dATP und dTTP mit DNA Polymerase I Klenow-Fragment aufgefüllt. Dieser Schritt war notwendig, da das Restriktionsenzym HaeIII im Gegensatz zu Eco RI glatte DNA-Enden erzeugt, die für eine DNA-Ligierung mit den Eco RI Enden inkompatibel sind. Ein weiterer Vorteil dieser Strategie ist die Regeneration der Eco RI -Stelle (Fig. 1). Der so vorbereitete Vektor wurde mit HaeIII/7-Fragment über Nacht bei 16°C mit T4 DNA-Ligase inkubiert. Sodann wurde der durch CaCl₂-Behandlung kompetent gemachte *E. coli* Stamm HB 101 mit der Ligasemischung transformiert und resistente Klone auf L-Broth-Platten, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten, selektioniert.

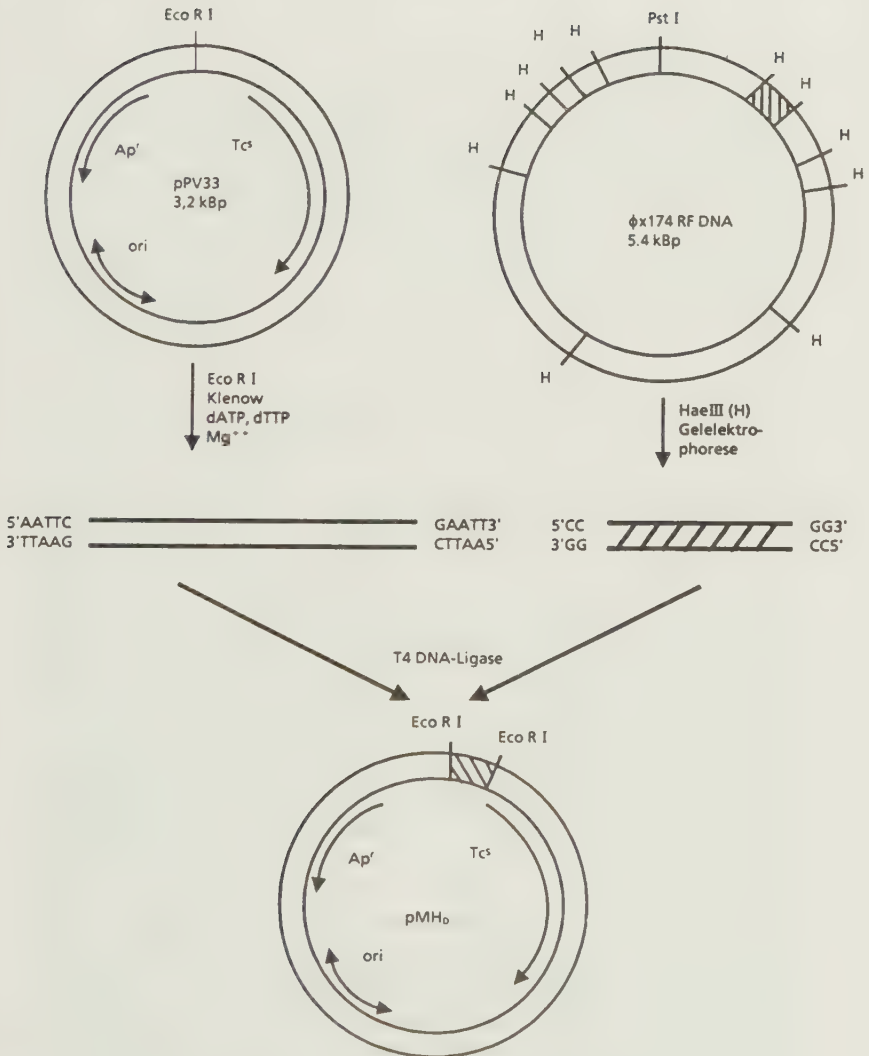


Fig. 1 Strategie der Klonierung des ϕ X174 HaeIII/7-Fragments in pPV33

Erklärung im Text.

Identifizierung der Klone

Von den Ampicillin resistenten Klonen wurden 200 willkürlich ausgewählt und weiter untersucht. In diesem Experiment schien wegen der nicht vorhandenen biologischen Selektion die Identifizierung von rekombinanten Plasmiden mittels Einzelkolonie-Aufschluß schwierig zu werden, da sich der geringe Molekulargewicht-Unterschied zwischen Vektor-DNA und rekombinanter DNA von nur 234 Bp in der Gelelektrophorese kaum nachweisen läßt. Zudem durften nicht allzu viele Rekombinante erwartet werden, da die Verknüpfung glatter DNA-Enden durch T4 DNA-Ligase nicht sehr effizient ist (Maniatis et al., 1982). Aus diesem Grund wurde die Methode der Koloniehybridisierung (Grundstein und Hogness, 1975) verwendet, mit der sich in relativ kurzer Zeit eine größere Anzahl von Kolonien untersuchen läßt. Dazu wurden die Klone auf zwei Ampicillin-haltige Agarplatten in einem Rechteckmuster zu je 100 überimpft und von dort auf Nitrocellulosefilter übertragen. Nach Amplifizierung der in den Bakterien enthaltenen Plasmide auf Chloramphenicolplatten wurden die Filter gegen ^{32}P -markierte, gelelektrophoretisch gereinigte RNA hybridisiert, die zuvor durch eine in vitro Transkription mit RNA Polymerase aus M. luteus an HaeIII/7-Fragment synthetisiert worden war. Die anschließende Autoradiographie zeigte folgendes Bild (Fig. 2): Von den 100 hybridisierten Kolonien ergaben etwa 40 ein positives Signal, also eine der Koloniegröße entsprechende Schwarzfärbung auf dem Röntgenfilm. Jedoch war die Intensität der Färbung unterschiedlich, was auf verschieden starke Hybridisierung schließen läßt. Deshalb wurden 10 Kolonien mit starker Hybridisierung mit derselben Anzahl von Kolonien der schwächeren Hybridisierung verglichen (ohne Beleg). Die Analyse der Klone durch Schnellaufschluß und Eco RI-Verdauung ergab folgendes Bild: Von den zehn stark hybridisierten Klonen enthielten fünf eine Insertion, die der Größe eines Fragment-Trimeren entsprach, ein Klon enthielt das Fragment als Dimeres, die restlichen Klone konnten nicht mit Eco RI geschnitten werden, was gelegentlich bei Schnellaufschüssen beobachtet wird, wenn das Nährmedium nicht vollkommen abgetrennt wurde. Bei der anderen Gruppe, die geringe Hybridisierung zeigte, hatten acht Klone das Fragment als Monomeres und zwei als Dimeres eingebaut. Bei der

Ligierung des Fragments mit sich selbst entstehen keine Eco R I Schnittstellen. Diese entstehen erst durch Verknüpfung des terminalen Basenpaares des HaeIII-Fragments mit der aufgefüllten Eco R I -Stelle des Vektors. Solche Insertionen sind folglich nur durch die Eco R I -Sequenz flankiert und lassen sich deshalb als Multimere durch Eco R I -Hydrolyse isolieren. Es korrelierten also in diesem Fall die Intensitätsunterschiede der Schwarzfärbung des Röntgenfilms der Koloniehybridisierung recht gut mit der Anzahl der 233 Bp langen Promotorfragmente.

Orientierung der klonierten DNA

Um die Orientierung des klonierten DNA-Fragments relativ zum Vektor zu bestimmen, wurden die erhaltenen Klone, die das Fragment als Monomeres eingebaut hatten, mit Rsa I hydrolysiert. Das insertierte Fragment enthält eine auf dem Fragment unsymmetrisch sitzende Rsa I -Schnittstelle, während der Vektor an den Positionen 134 und 2727 geschnitten wird. Enthält die Eco R I -Schnittstelle von pPV33 das ϕ x174 HaeIII/7 Fragment als Insertion, so liefert eine Rsa I -Verdauung drei DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe. Ist der m_E -Promotor in der richtigen Orientierung integriert, so sollten gemäß der DNA-Sequenz die Fragmente A (2594 Bp), B (654 Bp) und C (232 Bp) und bei der inversen Orientierung, die Fragmente A (2594 Bp), D (614 Bp) und E (272 Bp) entstehen.

Von acht analysierten Klonen enthielten drei die falsche Promotorrichtung, die restlichen fünf die richtige (ohne Beleg). Dabei entspricht die Länge der durch Rsa I -Verdauung entstandenen Fragmentbanden im Gel mit ihren aus der Sequenz berechneten Werten im Rahmen der Meßgenauigkeit überein. Zwei dieser Klone, pMH_D10 (richtige Promotorrichtung) und pMH_D6 (falsche Promotorrichtung) sind mit einem geeigneten Längenstandard in Fig. 3 dargestellt.

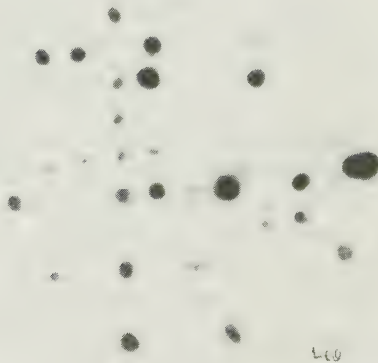


Fig. 2
Koloniehybridisierung der durch Klonierung des Restriktionsfragments ϕ X174 HaeIII/7 erhaltenen Plasmide.

Als Probe wurde ^{32}P -markierte RNA verwendet, welche zuvor durch *in vitro* Transkription an dem Restriktionsfragment ϕ X174 HaeIII/7 synthetisiert worden war.

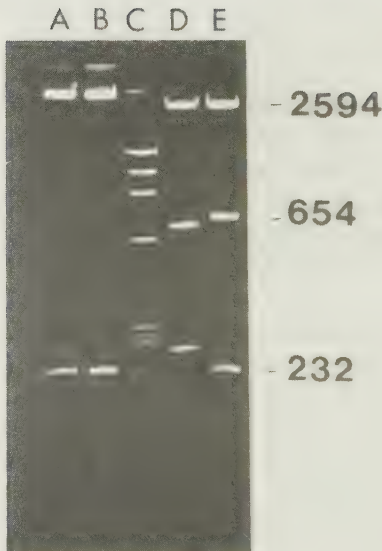


Fig. 3
Analyse der durch Klonierung des Restriktionsenzym ϕ X174 HaeIII/7 erhaltenen Plasmide mit Restriktionsenzymen

- Spur A: pMH₀6/Eco R I
- Spur B: pMH₀10/Eco R I
- Spur C: DNA-Längenstandard (ϕ X174 RF DNA/HaeIII)
- Spur D: pMH₀6/Rsa I
- Spur E: pMH₀10/Rsa I

rechts sind die Fragmentgrößen des mit Rsa I hydrolysierten Plasmids pMH₀10 eingezeichnet.

In vivo Aktivität in E.coli

Die hier angewandte Methode zur Ermittlung der in vivo Promotoraktivität beruht auf der Aktivierung des pPV33 codierten Tetracyclingens durch einen integrierten, fremden E. coli spezifischen Promotor. E. coli Zellen, die ein solches Plasmid enthalten, werden sich deshalb phänotypisch durch ihre Resistenz gegen Tetracyclin bemerkbar machen. Um die Resistenz zu quantifizieren, wurde der EOP₅₀-Wert eingeführt (efficiencies of plating). Man versteht darunter den Zahlenwert, bei dem ca. 50% der Bakterien nach Plattierung auf ein Selektionsmedium der nächsthöheren Konzentration nach 16 Stunden zu richtigen Kolonien heranwachsen (Rodriguez und Tait, 1983).

Plasmid pMH_D 10-haltige Bakterien wurden bis zur logarithmischen Phase geschüttelt, mit L-Broth Medium geeignet verdünnt und auf zuvor frisch gegossene Agarplatten verschiedener Tetracyclin-Konzentration plattiert. Nach 16,5 stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Kolonienanzahl pro Petrischale bestimmt. Bei einer Tetracyclin-Konzentration von 3 µg/ml im Agar konnte kein Kolonienwachstum mehr beobachtet werden. Der EOP₅₀-Wert für den m_E-Promotor in der richtigen Orientierung war deshalb 2-3 µg/ml (Tab. 1). Als Kontrolle diente pMH_D6, (bei dem der Promotor gerade umgekehrt integriert ist, und deshalb keine Promotoraktivität zu erwarten ist) und mit dem analog verfahren wurde. Dessen EOP₅₀-Wert betrug ebenfalls 2-3 µg/ml (Tab.1.). Das Plasmid pPV33 zeigte keine Tetracyclin-Resistenz in E. coli (EOP₅₀ < < 1µg/ml) HB 101 (Tab. 1).

Tetracyclin [µg/ml]	Anzahl der Kolonien		
	pMH _D 10	pMH _D 6	pPV33
0	57	71	86
1	47	43	0
2	48	13	0
3	0	0	0

Tab. 1 **Bestimmung der Promotoraktivität der rekombinanten Plasmide**
pMH_D10 und pMH_D6
 Erklärung im Text.

Die Insertion des m_E-Promotors in pPV33 hatte unabhängig von der Orientierung keine signifikante Tetracyclinresistenz bewirkt. Im Vergleich dazu bewirkt der E. coli spezifische natürliche Tetracyclin-Promotor in Plasmid pBR327 eine durch EOP₅₀ = 65 µg /µl gekennzeichnete Tetracyclinresistenz. Der m_E-Promotor ist deshalb als M. luteus spezifisch auch in vivo anzusehen und beweist die durch in vitro Transkription gefundene Spezifität.

Transkriptionsselektivität verschiedener *M. luteus* RNA Polymerase Präparationen

Um zu prüfen, ob *M. luteus* ebenso wie *Bacillus subtilis*, *E.coli* und *Streptomyces coelicolor* neben dem bekannten Sigmafaktor (Lill *et al.*, 1977b) über weitere dieser Promotorerkennungselemente verfügt, bietet sich zunächst die Möglichkeit an, verschieden isolierte RNA Polymerase Präparationen in der *in vitro* Transkription an geeigneten Matrizen zu vergleichen. Sollte eines dieser Enzympräparate einen weiteren Sigmafaktor als Verunreinigung enthalten, so wäre, bedingt durch dessen unterschiedliche Initiationsspezifität (Cowing *et al.*, 1985; Westpheling *et al.*, 1985), mit dem Auftreten einer zusätzlichen RNA bei der "run off"-Transkription zu rechnen.

So entdeckte Johnson *et al.* (1983) bei der *in vitro* Transkription an einem klonierten *B.subtilis* DNA-Fragment mit teilweise gereinigtem Sigma-37 Holoenzym (abgekürzt E-37) ein zusätzliches "run-off" Transkript, welches das hochgereinigte Enzym nicht zu synthetisieren vermochte. Die weitere Analyse zeigte, daß diese RNA durch einen weiteren Sigmafaktor mit dem Molekulargewicht 32 000 initiiert worden war. Daraus folgt, daß auf dem Wege zum hochgereinigten Enzym, der meist über mehrere Chromatographie-Schritte verläuft, eine RNA Polymerase-Form im Verlauf der Anreicherung abgetrennt wurde. Zudem ist bekannt, daß verschiedene RNA Polymerase-Formen durch unterschiedliche Ionenstärke bei einem Chromatographieschritt eluiert werden können (Doi, 1982a). Eine elegante Methode, die RNA Polymerase direkt, ohne Salzbehandlung aus dem Zellextrakt zu isolieren, ist die Chromatographie an Heparin-Agarose (Chamberlin, 1983). Durch diese Prozedur gewinnt man eine Enzympräparation, die direkt für die *in vitro* Transkription einsetzbar ist und mit Erfolg zur Isolierung zweier Sigmafaktoren in *S.coelicolor* (Westpheling *et al.*, 1985) geführt hat.

Eine weitere Möglichkeit, einen unbekannten Sigmafaktor zu entdecken, ist bei Jaehning *et al.* (1979) beschrieben. Sie isolierten die *B.subtilis* RNA Polymerase nach einer von Burgess und Jendrisak (1975)

für die E. coli RNA Polymerase veröffentlichten Vorschrift und entdeckten mit dieser Präparation bei der in vitro Transkription an T7 DNA ein unbekanntes Transkript. Die weitere Analyse dieser Präparation ergab, daß diese mit einem weiteren Sigmafaktor verunreinigt war, und bedingt durch dessen unterschiedliche Initiationsspezifität diese RNA synthetisiert worden war. Da auch in E. coli zwei Sigmafaktoren nachweisbar sind, wenn die RNA Polymerase nach Burgess und Jendrisak (1975) isoliert wird (Grossman et al., 1984), scheint diese Isolierungsvorschrift von gewisser Allgemeingültigkeit für das Auffinden von Sigmafaktoren zu sein. Im folgenden sollte deshalb das M. luteus Enzym auf verschiedene Weise isoliert werden und dessen Transkriptionsspezifität mit einer bekannten M. luteus Polymerase Präparationen (Lill et al., 1977) verglichen werden.

Charakterisierung der Präparationen

Anreicherung nach Burgess und Jendrisak (1975)

Das chromatographische Verhalten von M. luteus RNA Polymerase an DNA-Cellulose, welche durch Polymin P-Fällung und durch Konzentrierung mit Ammoniumsulfat vorgereinigt worden war (Rauschel, 1982), ist in Fig. 4 dargestellt. Die gesamte RNA Polymerase Aktivität wird bei einer Ionenstärke von 0,35 - 0,45 M KCl im linearen Salzgradienten eluiert. Damit zeigt das M. luteus Enzym an DNA-Cellulose ähnliches Elutionsverhalten wie E. coli RNA Polymerase, die zwischen 0,3 und 0,45 M Salz im Eluat erscheint (Burgess und Jendrisak, 1975). Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelanalyse der Säulenfraktionen zeigt, daß Polypeptide mit einer gelelektrophoretischen Mobilität, die der $\beta\beta'$ -Untereinheiten der RNA Polymerase entsprechen, im Durchbruch der Säulenchromatographie nahezu fehlen, während sie mit großer Intensität innerhalb des Aktivitätsgipfels zu sehen sind (Fig. 5). Es ist interessant festzustellen, daß am Anfang des Salzgradienten (Fraktion 130) neben Fremdprotein nahezu nur die Untereinheiten $\beta\beta'$

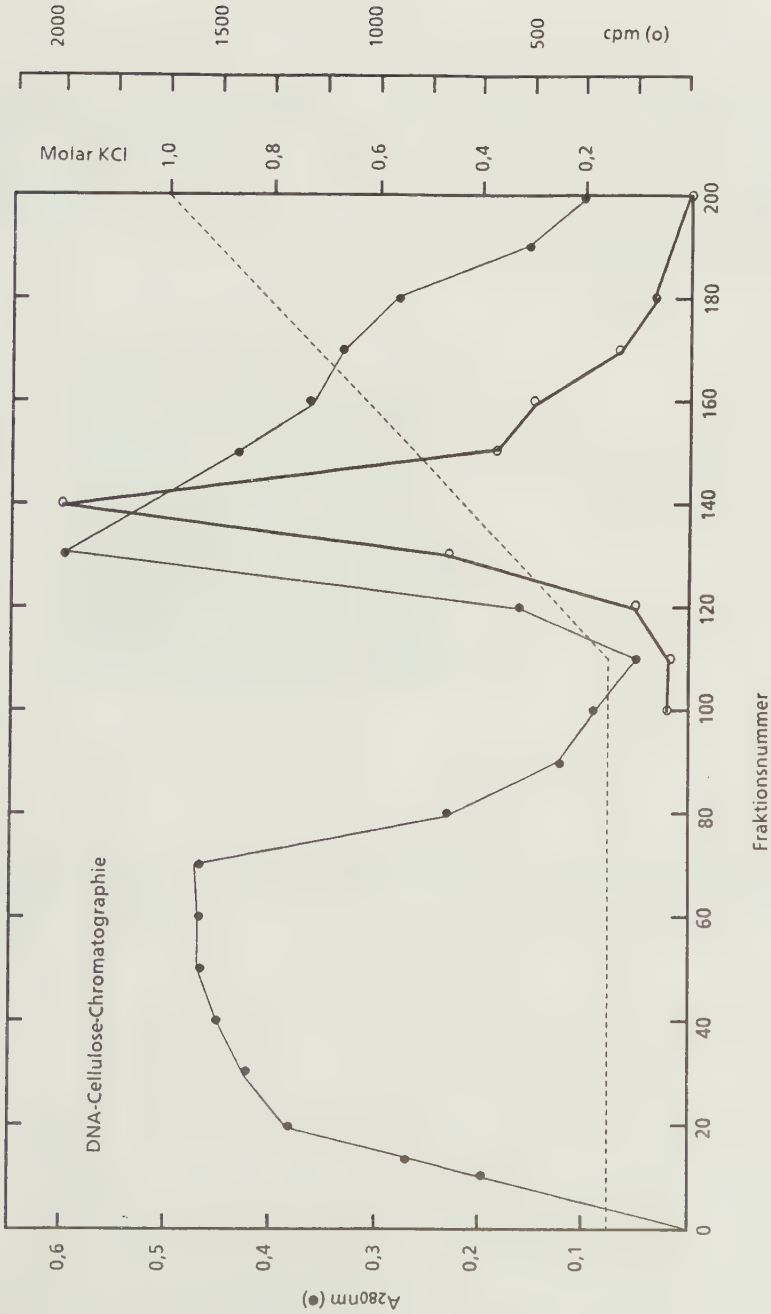


Fig. 4 Chromatographie von vorgereinigtem *M. luteus* Zellextrakt an DNA-Cellulose

zu Fig. 4

Der aus 100 Gramm gefrorenen *M. luteus* Zellen gewonnene und durch Polymyxin P und Ammoniumsulfat vorgereinigte Zellextrakt (Rauschel, 1982) wurde nach Dialyse gegen TGED-Puffer, der 0,15 M KCl enthielt, auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte DNA-Cellulosesäule (3 cm x 11 cm) gegeben. Die DNA-Cellulose wurde nach dem Verfahren von Lowe *et al.* (1979) hergestellt. Die Säule wurde mit drei Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen und über Nacht mit einem 400 ml linearen Salzgradienten von 0,15 M bis 1,0 M KCl in TGED-Puffer eluiert. Fraktionen von etwa 5,5 ml wurden gesammelt und Aliquots (10 μ l) auf RNA Polymeraseaktivität an Kalbthymus-DNA untersucht (o-o). ●-●, Absorption bei 280 nm; -----, Ionenstärke. Alle Manipulationen wurden bei 4°C durchgeführt.

TGED-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,9/25°C; 17% (v/v) Glycerin
0,1 mM EDTA; 0,1 mM DTE

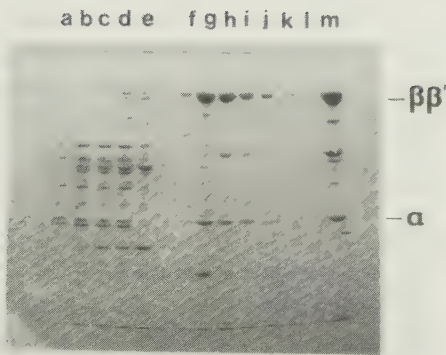


Fig. 5
Natriumdodecylsulfat-Polyacryl-
amidgelelektrophorese von Frak-
tionen der DNA-Cellulose-Chro-
matographie

Die Auftrennung von Aliquots (15 μ l) der angegebenen Säulenfraktionen erfolgte durch Elektrophorese in einem 10%igen Polyacrylamidgel in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat. Die rechte Spur (m) zeigt die *M. luteus* Polymerase, welche nach Lill *et al.* (1977) isoliert wurde (Standardenzym). a: 10; b: 30; c: 40; d: 60; e: 80; f: 120; g: 130; h: 140; i: 150; j: 160; k: 170; l: 180.

und α der RNA Polymerase zu sehen sind. Dieses Verhalten erinnert an Coreenzym bei der Chromatographie an DNA-Agarose (Rauschel, 1982).

Fraktionen, die die RNA Polymerase Aktivität enthielten (Fraktion 125 - 160) wurden vereinigt, konzentriert und an Biogel A 1,5m chromatographiert. Wie in Fig. 6 zu sehen ist, fällt das Absorptionsmaximum bei 280 nm mit dem Aktivitätsmaximum zusammen. Untersucht man die aktiven Fraktionen in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, so erkennt man im ersten Teil des Aktivitätsgipfels (Fraktion 12 - 15 in Fig. 7) neben dem charakteristischen Untereinheiten $\beta\beta'\sigma$ der RNA Polymerase noch Fremdproteine, die ab Fraktion 16 deutlich in ihrer Intensität nachlassen (Abb. 4). Es ist bemerkenswert, daß an der Stelle, in der die Polymerase-Aktivität eine Schulter zeigt, auch das Fremdprotein verschwindet (Abb. 7 Fraktion 17).

Bei dieser Gelfiltration wird das durch DNA-Cellulose-Chromatographie erhaltene Enzympräparat in zwei Präparate fraktioniert, von denen eine Präparation nur die charakteristischen RNA Polymerase Untereinheiten $\alpha\beta\beta'\sigma$ aufzuweisen scheint (Fraktion 16 mit 20 in Fig. 7), während die andere Präparation (Fraktion 13 mit 15 in Fig. 7) noch zusätzliche Proteine enthält. Die reineren Fraktionen (Fraktion 16 mit 20) wurden vereinigt, konzentriert und als Fraktion II bezeichnet. Die mit Fremdprotein verunreinigten Fraktionen 13 mit 15 der Biogel-Gelfiltration, die ebenfalls vereinigt und konzentriert wurden, werden im folgenden als Fraktion I bezeichnet.

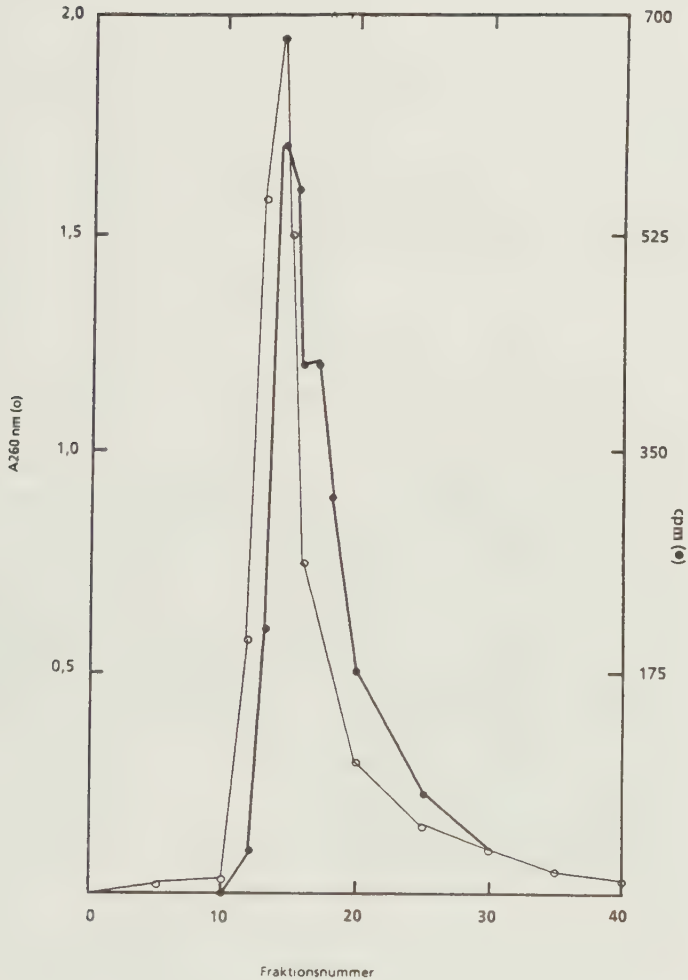


Fig. 6 Chromatographie der aktiven Fraktionen der DNA-Cellulose-Chromatographie an Biogel A 1,5 m

Die aktiven Fraktionen der DNA-Cellulosechromatographie (Fraktion 125 mit 160 in Fig. 4) wurden vereinigt, mit festem Ammoniumsulfat (0,4 g pro Milliliter) versetzt, 30 Minuten bei 4°C gerührt und anschließend bei 9 000 rpm für 45 Minuten in einem GSA-Rotor in einer Sorvallzentrifuge zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in einem geeigneten Volumen TGED-Puffer gelöst, über Nacht gegen TGED-Puffer, der 0,5 M KCl enthält, dialysiert und anschließend auf eine Biogelsäule (1,5 cm x 67 cm) gegeben, die zuvor mit TGED-Puffer, der 0,5 M KCl enthält, äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 8 ml pro Stunde eluiert. Fraktionen von 2,5 Milliliter wurden gesammelt und Aliquots (5µl) auf RNA-Polymeraseaktivität an Kalbsthymus DNA untersucht (●-●). (o-o), Absorption bei 280 nm. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. TGED-Puffer: 10mM Tris-HCl pH 7,9 (25°C); 17% (v/v) Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM DTE.

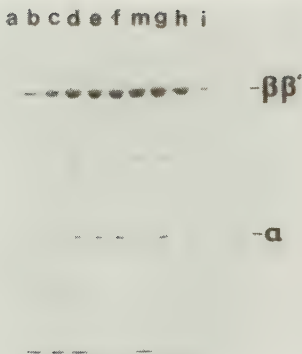


Fig. 7

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese von Fraktionen der Chromatographie an Biogel A 1,5 m

Die Auftrennung von Aliquots (10 μ l) der angegebenen Säulenfraktionen erfolgte durch Elektrophorese in einem 10%igen Polyacrylamidgel. m: RNA-Polymerase-Standardenzym; a: 12; b: 13; c: 14; d: 15; e: 16; f: 17; g: 18; h: 20; i: 25.

Chromatographie an Heparin-Sepharose und Phosphocellulose

Der aus M. luteus Zellen durch Lysozym - und Ultraschallbehandlung gewonnene Rohextrakt wurde auf eine Heparin-Sepharose-Säule (Pharmacia) gegeben, die in Anlehnung an Chamberlin et al. (1983) äquilibriert worden war. Nach 75-minütiger Adsorption bei 4°C wurde mit dem vierfachen Säulenvolumen eines 0,05 M salzhaltigen Puffers nachgewaschen und anschließend mit einem Puffer, der 0,6 M KCl enthielt Protein eluiert. Die Extinktionsmessung der Fraktionen bei 280 nm ergab, daß viel Protein unabsorbiert die Säule passierte (Fig. 8). Bei der Elution mit 0,6 M KCl erscheint ein zweiter Proteingipfel, der im Gegensatz zum ersten Proteingipfel sowohl RNA Polymerase Aktivität als auch die charakteristischen Untereinheiten der RNA Polymerase in der Gelelektrophorese zeigte. Die aktiven Spitzenfraktionen (Fraktion 21 und 22) wurden vereinigt, konzentriert und gegen Lagerpuffer dialysiert.

Um zu prüfen, ob diese Präparation für die in vitro Transkription geeignet ist, wurde diese auf DNase-, RNase- und Protease-Aktivität untersucht. Dazu wurde käufliche Lambda-DNA (Biolabs) mit und ohne Enzym für eine Stunde bei 37°C in einem Puffer inkubiert, der außer einem Salzgemisch sämtliche vier Ribonukleosidtriphosphate enthielt (Transkriptionspuffer). Die auf diese Weise behandelte DNA wurde anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Gelanalyse zeigte, daß diese Präparation DNase Aktivität besaß, da die Lambda-DNA nur in Anwesenheit des Enzyms abgebaut wurde. Analog wurde die RNase Aktivität mit käuflicher 16S- und 23S-rRNA untersucht. Die Analyse im Gel zeigte, daß sowohl die 16S und 23S rRNA nur in Anwesenheit des Enzyms verschwanden. Die Präparation zeigte keine Proteaseaktivität, da das vielbandige Proteinmuster auch nach 60 minütiger Inkubation bei 37°C unverändert blieb (ohne Beleg).

Um diese störenden Fremdaktivitäten abzutrennen, wurde die Präparation an Phosphocellulose nachgereinigt (vergl. Lill et al., 1977).

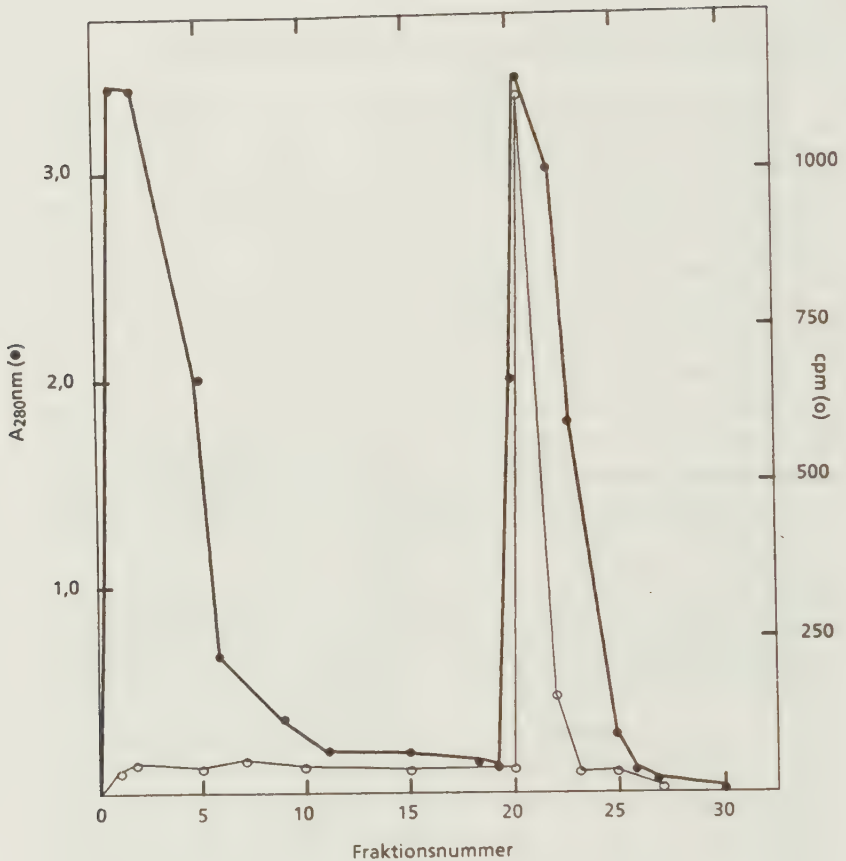


Fig. 8 Chromatographie von *M. luteus* Zellextrakt an Heparin-Sepharose

Zu zwei Gramm gefrorenen *M. luteus* Zellen wurde nach Suspension in 6 ml Puffer H 10 mg festes Lysozym zugegeben und dieses Gemisch für 5 Minuten bei 37°C unter Rühren inkubiert. Nach Abkühlung der Suspension auf 0°C wurde diese bei derselben Temperatur mit Ultraschall behandelt und anschließend bei 20 000 rpm 40 Minuten in einem SS34-Rotor bei 4°C in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Sechs Milliliter Überstand wurden auf eine Heparin-Sepharose-Säule (16,5 cm x 1,3 cm), die zuvor mit Puffer A äquilibriert worden war, aufgetragen. Nach 75minütiger Adsorption des Rohextrakts an die Säulenmatrix bei 4°C wurde die Säule mit etwa vier Säulenvolumen Puffer L gewaschen (Fraktionsvolumen 2,4 ml) und sodann mit Puffer E (5 ml/h) eluiert. Fraktionen von 1,8 ml wurden gesammelt und 12,5 µl Aliquots auf Polymerase Aktivität an denaturierter Kalbthymus-DNA (o-o) untersucht. (●-●), Absorption bei 280 nm.

Puffer H: 10mM Tris-HCl pH 7,9/25°C, 10mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 50 mM NaCl, 0,5 mM PMSF, 20% (v/v) Glycerin

Puffer A: 10mM Tris-HCl pH 7,9/25°C, 10 mM Mg Cl₂, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE

Puffer L: 10 mM Tris-HCl pH 7,9/25°C, 10 mM Mg Cl₂, 1mM EDTA, 0,1 mM DTE, 20% (v/v) Glycerin, 0,05 M NaCl

Puffer E: 10 mM Tris-HCl pH 7,9/25°C, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 20% (v/v) Glycerin, 0,6 M NaCl

Wieder kann ein Proteingipfel, der kaum RNA Polymerase Protein und Aktivität enthält, mit 0,2 M salzhaltigem Puffer von der Säule gewaschen werden, während ein zweiter Proteingipfel, der die Aktivität und RNA Polymerase Protein neben Fremdprotein enthält, mit 0,3 M Salz eluiert wird (ohne Beleg). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und auf DNase und RNase Aktivität untersucht, wie zuvor beschrieben. Das Ergebnis war, daß unter diesen Bedingungen nach diesem Chromatographieschritt keine DNase und RNase Aktivität mehr beobachtet werden konnte. Diese RNA Polymerase Präparation wird im folgenden als HP-Enzym (Heparin-Phosphocellulose-Enzym) bezeichnet. Die densitometrische Auswertung der Gelanalyse des HP-Enzyms ist in Fig. 9 gezeigt.

Fraktionierung von RNA Polymerase Rohextrakt an DNA-Agarose und Phosphocellulose

Die Fraktionierung des RNA Polymerase Rohextrakts an DNA-Agarose und Phosphocellulose wurde in Anlehnung an meine Diplomarbeit durchgeführt. Dazu wurde das durch Polymyxin-P-Fällung und Ammoniumsulfat-Fällung konzentrierte Präparat hier an DNA-Agarose in drei Stufen fraktioniert.

Es wurden drei Eluate erhalten: das 0,35 M KCl Eluat, das 0,5 M KCl Eluat und das 1,0 M KCl Eluat. Diese Eluate wurden sodann getrennt an Phosphocellulose (Lill et al., 1977) weiterfraktioniert. Die einzelnen Schritte der Fraktionierung sind der Fig. 10 zu entnehmen. Das 0.5 M KCl Eluat zeigte bei der Gelanalyse mit Silberfärbung kein RNA Polymerase Protein, es kann also folglich auf dessen Besprechung verzichtet werden. Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese der verbleibenden Fraktionen zeigt neben einigen Verunreinigungen die prominenten RNA Polymerase Polypeptide $\alpha\beta\beta'$ (Fig. 11). Bei Fraktion 10 und 11 ist noch ein Protein mit der elektrophoretischen Mobilität wie Sigma zu sehen, das bei den anderen

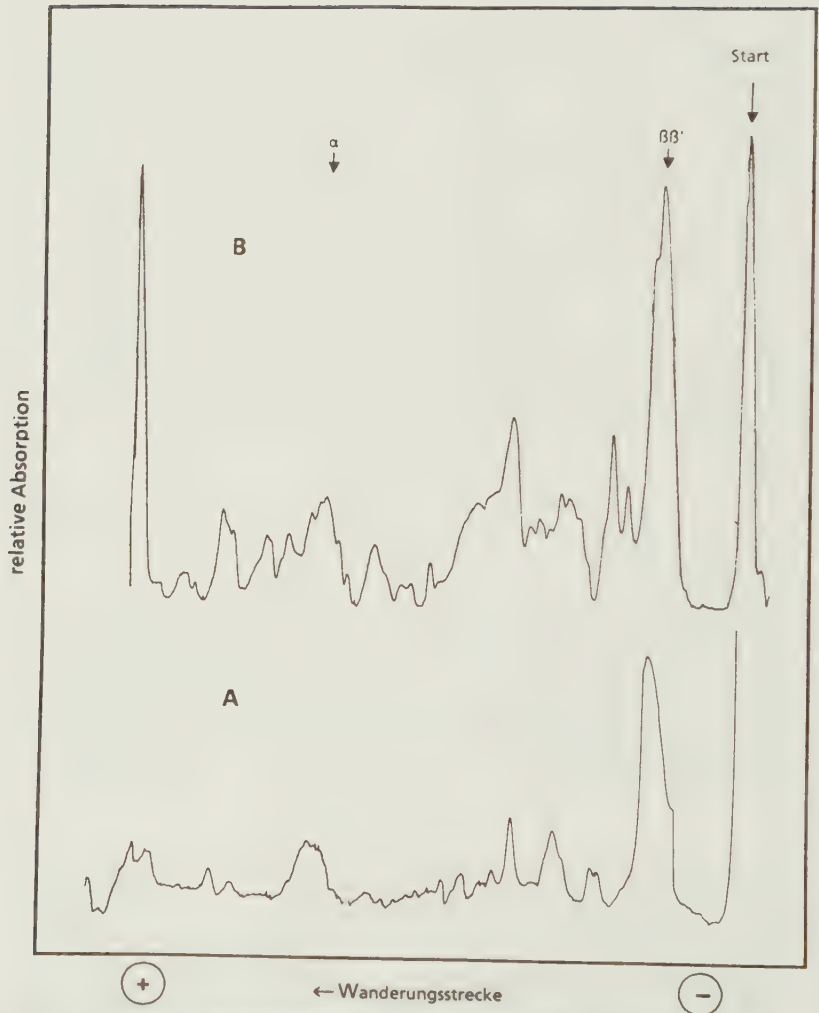
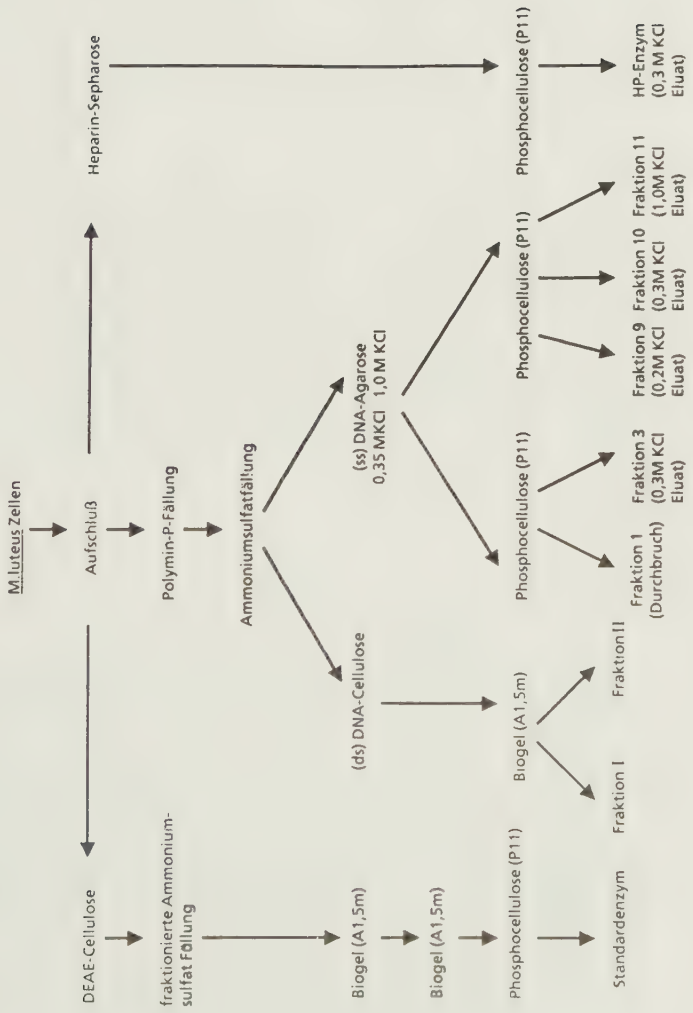


Fig. 9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese von RNA Polymerase-Standardenzym und HP-Enzym

Die Enzympräparate wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch Elektrophorese aufgetrennt und durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Die Positionen der prominenten RNA Polymerase Untereinheiten BB' und α sind eingezeichnet.

A: Densitometrische Auswertung des Polyacrylamidgels der Standardpräparation
B: Densitometrische Auswertung des HP-Enzyms

Fig. 10 Übersichtsdiagramm zur Isolierung von M. luteus RNA Polymerase



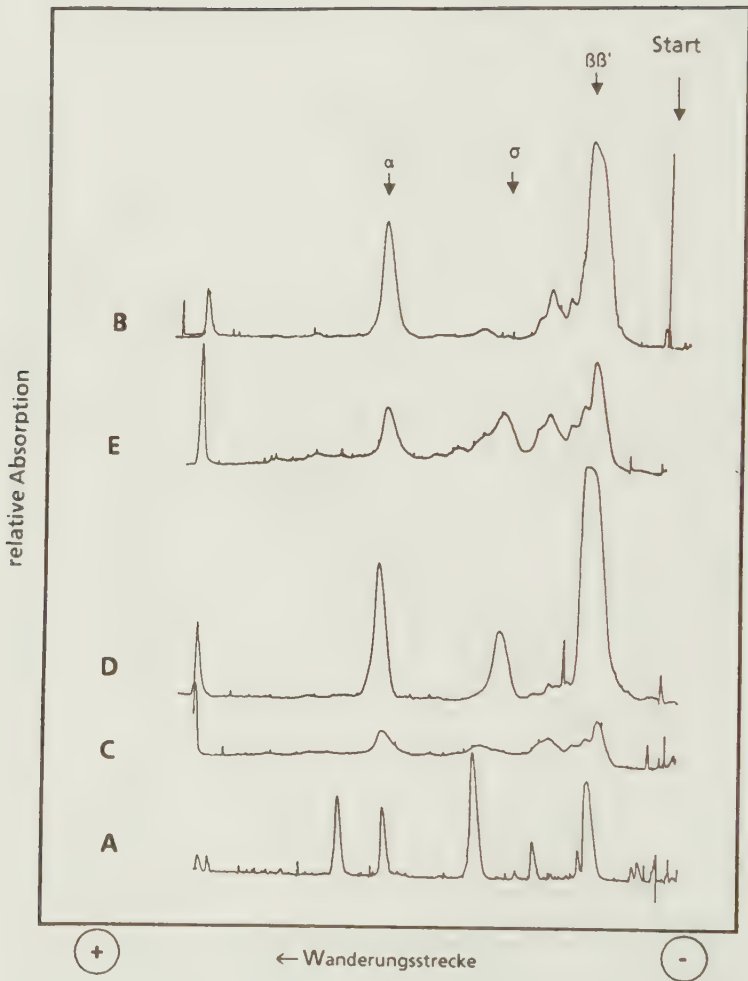


Fig. 11 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese der RNA Polymerase Fraktionen 1, 3, 9, 10, 11

Die Enzympräparate wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch Elektrophorese aufgetrennt und durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Die Positionen der RNA Polymerase Untereinheiten $\alpha\beta\beta'\sigma$ sind eingezeichnet.

A: Fraktion 1; B: Fraktion 3; C: Fraktion 9; D: Fraktion 10
E: Fraktion 11

Faktionen in dieser Analyse nicht nachweisbar ist. Da sämtliche Faktionen vor der Gelelektrophorese nicht konzentriert wurden, kann das Fehlen dieser Proteins in der Gelanalyse auch auf zu geringe Proteinkonzentration zurückzuführen sein. Da nur die Faktionen 1, 3, 9, 10 und 11 nennenswerte Aktivität an Kalbsthymus-DNA zeigten (ohne Beleg), wurden nur diese Faktionen in die weitere Besprechung mit einbezogen.

Standardisolierung der M. luteus RNA Polymerase nach Lill et al. (1977)

Dieses Enzym (Standardenzym) wird in unserem Laboratorium seit geraumer Zeit isoliert und ist eingehend charakterisiert worden (Lill et al., 1977; Lill und Hartmann, 1977; Lill et al., 1975; Leib et al., 1980). Es wurde mir für Transkriptionsstudien zur Verfügung gestellt und ist nach gelelektrophoretischer Auftrennung in der Figur Fig. 5 zu sehen. Die chromatographischen Schritte der Enzymisolierung sind in Figur 10 dargestellt.

Diese Resultate zeigen, daß die M. luteus RNA Polymerase durch dieselben Chromatographieschritte wie das E. coli Enzym angereichert werden kann. Allen Enzympräparationen ist gemeinsam, daß sie außer den bekannten Untereinheiten der RNA Polymerase ($\alpha\beta\beta'\sigma$) noch Proteine enthalten, die zusammen mit der Polymerase eluiert werden. Eine nähere Charakterisierung dieser Fremdproteine ist erst dann lohnenswert, wenn bei der vergleichenden Transkription dieser verschiedenen isolierten Präparate mit dem Standardenzym signifikante Unterschiede in der Transkriptionsselektivität festgestellt werden.

Vergleichende Transkription an verschiedenen Matrizen

Transkription an dem E. coli Plasmid pBR322

Inkubiert man hochgereinigtes superhelikales E. coli Plasmid pBR322 (Bolivar et al., 1977) als DNA Matrice mit verschiedenen isolierten RNA Polymerase Präparationen (Fig. 10) aus M. luteus im in vitro Transkriptionssystem bei einer Salzkonzentration von 0,2 M KCl und trennt die entstehenden Transkripte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel auf, so erkennt man neben vielen schwach markierten RNAs eine besonders starke RNA-Bande, die mit derselben elektrophoretischen Mobilität wie die RNA I wandert (Brack et al., 1984; Fig. 12). Diese DNA wird von allen Präparaten außer von Fraktion 1 synthetisiert. Es fällt auf, daß die RNA I bei annähernd gleicher Enzymkonzentration von den verschiedenen RNA Polymerase Präparationen mit unterschiedlicher Intensität erzeugt wird, was verständlich wird, wenn man berücksichtigt, daß der Gehalt an aktiven Enzymmolekülen in RNA Polymerase Präparationen in einem Bereich von 20 bis 90% variieren kann (Chamberlin et al., 1979). Da an ungeschnittenem Plasmid transkribiert wurde, folgere ich, daß alle Enzympräparate (außer Fraktion 1) die für die RNA I Synthese notwendigen Initiations- und Terminations-Signale auf pBR322 erkennen. Interessant in diesem Zusammenhang ist, daß selbst hochgereinigtes Coreenzym (Fraktion 3) immer noch RNA I-Synthese, wenn auch in sehr geringem Ausmaß-, zeigt, was nur bedeuten kann, daß der bekannte M. luteus Sigmafaktor (Lill et al., 1977b) in dieser Präparation nicht quantitativ abgetrennt worden ist. Weiterhin sieht man in Fig. 12, daß alle RNA Polymerase Präparationen ein nahezu einheitliches Transkriptmuster erzeugen, wenngleich auch das Verhältnis der Intensitäten zwischen der prominenten RNA I-Bande - und den anderen Transkripten großen Schwankungen unterworfen ist. Ein prominentes Transkript, daß sich durch unterschiedliche Transkriptionsinitiationsselektivität zu erkennen geben würde, konnte nicht beobachtet werden. Dieses Ergebnis bedeutet jedoch nicht, daß in M. luteus keine weiteren Transkriptionsfaktoren vorkommen. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß in dieser doch relativ kleinen Matrice

spezifische Initiationssequenzen für diesen hypothetischen Faktor fehlen. Es wäre folglich interessant, die Transkriptionsspezifität der Enzympräparate an einem wesentlich größeren DNA-Molekül wie Lambda-DNA zu vergleichen.

Transkription an Lambda-DNA

Käufliche Lambda DNA (Biolabs) wurde vollständig mit dem Restriktionsenzym Hae III fragmentiert. Für die Wahl des Enzyms waren zwei Gründe ausschlaggebend. Es sollte zunächst eine Restriktionsendonuklease mit einer Tetranukleotid-Erkennungssequenz sein, da diese im Vergleich zu Enzymen mit Hexanukleotid-Erkennungssequenz DNA-Moleküle öfter spalten. Dadurch wird in Lambda-DNA ein Gemisch von kurzen Fragmenten erzeugt, die in der in vitro Transkription kleine, bequem in Gelelektrophorese analysierbare Abbruchtranskripte bedingen. Zum anderen sollte das Restriktionsenzym nicht in den elementaren Promotorbereichen der -10- und -35-Region von bekannten M. luteus Promotoren auf E. coli Matrizen spalten. Diese Bedingungen erfüllt neben Hae III auch noch eine Anzahl weiterer Restriktionsenzyme wie Hpa II, Sau 3A und Alu I. Setzt man das durch vollständige Verdauung mit Hae III erzeugte DNA-Fragmentgemisch in die in vitro Transkription mit verschiedenen isolierten RNA Polymerase Präparaten ein, so erkennt man, daß nur die Enzymfraktionen 10, 11 HP-Enzym (Fig. 10) sowie die Standardenzympräparation unter diesen Bedingungen Transkriptions-Selektivität an dieser DNA Matrize besitzen. (Fig. 13). Dabei fällt ein sehr intensives, etwa 190 Nukleotide langes Transkript in einem sonst einheitlichen Transkriptmuster auf, das alle vier Enzym-Präparate erzeugen. Da auch E. coli RNA Polymerase, neben vielen RNAs dieses Transkript synthetisiert, kann unter der Voraussetzung identischer Termination angenommen werden, daß diese RNAs von dem gleichen Promotor initiiert werden. Wie jedoch aus den relativen Intensitäten dieser RNA-Banden hervorgeht, beträgt die geschätzte Syntheserate des M. luteus Enzyms im Vergleich zum E. coli Enzym unter diesen Bedingungen das fünf- bis sechsfache. Eine weitere prominente RNA,

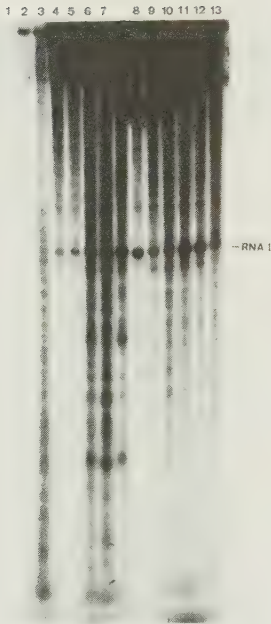


Fig. 12

Analyse der *in vitro* Transkripte verschiedener RNA Polymerase-Präparationen transkribiert an p BR 322

Spur 1: Fraktion 1; Spur 2: Fraktion 3; Spur 3: Fraktion 9; Spur 4: Fraktion 10; Spur 5: Fraktion 11; Spur 6: Fraktion I; Spur 7: Fraktion II; Spur 8: HP-Enzym; Spur 9 - 12: verschiedene Standard-Enzyme; Spur 13: *E. coli* Polymerase

Die Transkription erfolgte (im Transkriptionssystem S. 23) in einem Endvolumen von 50 μ l mit 5 μ g DNA als Matrize. Die Transkripte wurden in einem 8%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

(zu Fraktionsnummern vergleiche Fig. 10)

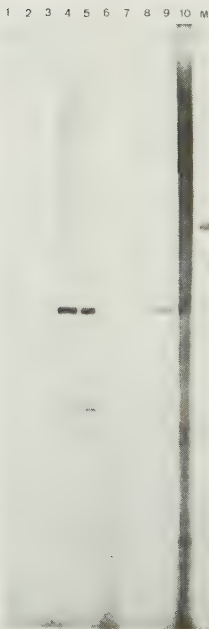


Fig. 13

Analyse der *in vitro* Transkripte verschiedener *M. luteus* RNA Polymerase Präparationen transkribiert am HaeIII hydrolysierten Lambda-DNA

Spur 1: Fraktion 1; Spur 2: Fraktion 3; Spur 3: Fraktion 9; Spur 4: Fraktion 10; Spur 5: Fraktion 11; Spur 6: Fraktion I, Spur 7: Fraktion II; Spur 8: HP-Enzym; Spur 9: Standardenzym; Spur 10: *E. coli* Polymerase; M: ϕ X174/HaeIII-DNA-Längenstandard.

Die Transkription erfolgte (im Transkriptionssystem S.23) in einem Endvolumen von 125 μ l mit 3 μ g fragmentierter Lambda-DNA als Matrize. Die RNAs wurden in einem 4%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

(zu Fraktionsnummern vergleiche Fig. 10)

die nur von einer einzelnen Präparation synthetisiert wird, wird ebenso, wie bei der Transkription an pBR322, mit HaeIII verdauter Lambda-DNA nicht beobachtet. Um auszuschließen, daß durch die HaeIII-Behandlung der Matrize essentielle, für die Transkriptions-Initiation eines hypothetischen Sigmafaktors wichtige Bereiche zerstört wurden, wurde das Experiment unter ähnlichen Bindungen, jetzt jedoch mit HpaII, Alu I oder Sau 3A verdauter Lambda-DNA wiederholt. Abermals beobachtet man, daß nur die Fraktionen 10, 11, HP-Enzym und Standardenzym ein einheitliches Transkriptmuster (ohne Beleg) zeigen. Dabei ist interessant festzustellen, daß alle vier Enzympräparate ebenfalls ein sehr intensives Transkript synthetisieren. Im Falle der Transkription an Alu I fragmentierter Lambda-DNA ist diese RNA ca. 190 Nukleotide lang, während sie bei der entsprechenden Transkription an durch HpaII und Sau 3A fragmentierter Lambda-DNA ungefähr 170 Nukleotide mißt (ohne Beleg). Die an pBR 322 und Lambda-DNA unterschiedliche Aktivität der verschiedenen Fraktionen (z.B. Fraktion 1, 3, 9, I und II) wird möglicherweise nicht ausreichend durch die Tatsache erklärt, daß bei den Versuchen mit Lambda-DNA nur 1/24 der DNA-Konzentration eingesetzt wurde. Auch eine Inaktivierung der Enzympräparate kommt nicht in Frage, da die Experimente mit pBR322 nach denen mit Lambda-DNA ausgeführt wurden.

Somit ist ersichtlich, daß M. luteus RNA Polymerase-Präparationen Promotoren auf fragmentierter Lambda DNA erkennen, die auch von E. coli Enzym erkannt werden (Fig. 12 und 13). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Beobachtungen anderer Autoren, die zeigen konnten, daß M. luteus Standardenzym E. coli Promotoren auf ϕ x174 (Ernst, 1981) sowie Promotoren auf pBR322 (Brack, 1983) in der *in vitro*-RNA-Synthese benützt. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, daß Proteine, die bei diesen Präparationen mit der RNA Polymerase eluieren, keinen signifikanten Einfluß auf die Promotorspezifität haben.

Warum wurde bei M. luteus kein Hinweis auf die Existenz eines weiteren Sigmafaktors erhalten, obgleich diese attraktive Möglichkeit der Promotorselektivität bei den Sporenbildern Bacillus subtilis und

Streptomyces coelicolor (Wiggs et al. 1981; Haldenwang and Losick, 1979; Johnson et al., 1983; Westpheling et al., 1985) und auch in E. coli entdeckt wurden (Landick et al., 1984, Grossman et al., 1984), was für ein universelles Vorkommen dieser Transkriptionsfaktoren spricht (Travers, 1985)?

Zum einen könnte die Proteinkonzentration dieses hypothetischen Sigmafaktors in den RNA Polymerase-Präparationen zu gering gewesen sein, um ein eindeutiges neues Transkript zu erhalten. Andererseits ist es vorstellbar, daß dieser Faktor sehr wohl in ausreichender Menge in den Polymerase-Präparationen vorkommt, aber die Signalsequenz zum Nachweis des Sigmafaktors in den von mir verwendeten E. coli Matrizen fehlt. Es wäre denkbar, daß diese Promotoren einen wesentlich höheren CG-Gehalt aufweisen, welcher in E. coli DNAs so nicht vorhanden ist.

Selektive Transkription fragmentierter *M.luteus* DNA

Charakterisierung der Reaktion

Bei der vollständigen Hydrolyse von zellulärer *M. luteus* DNA mit dem Restriktionsenzym *Alu I* entsteht ein Fragmentgemisch heterogener Länge, wobei DNAs zwischen 300 Bp und 1500 Bp Länge mit großer Intensität in der gelelektrophoretischen Analyse zu sehen sind. Transkribiert man dieses Fragmentgemisch *in vitro* mit *M. luteus* RNA Polymerase (Lill *et al.*, 1977), so erkennt man in der Autoradiographie eine Population diskreter, prominenter RNAs auf einem homogenen, die gesamte Gellänge durchziehenden dunklen Hintergrund (Fig. 14, Spur 7). Wiederholt man dieses Experiment unter identischen Bedingungen mit *E. coli*-Enzym, so beobachtet man diese Transkripte nicht (Fig. 14, Spur 3). Dieses Ergebnis ist unabhängig von der Belichtungsdauer des Röntgenfilms. Wie aus Fig. 14, Spur 3 hervorgeht, entsteht bei der Transkription mit *E. coli* Polymerase ein gleichmäßiger schwärzlicher Hintergrund, dessen Intensität jedoch im Vergleich zur entsprechenden Gelspur des *M. luteus*-Enzyms wesentlich größer ist. Die Längenbestimmung mittels radioaktiver ϕ x174/HaeIII DNA als Längenstandard ergibt für die sechs prominenten Transkripte A bis F ungefähr folgende Längen (Fig. 15):

Transkript A: 520 Nukleotide; Transkript B: 470 Nukleotide; Transkript C: 450 Nukleotide; Transkript(e) D: 310 Nukleotide; Transkript E: 240 Nukleotide; Transkript(e) F $\approx$ 190 Nukleotide. Dabei wurde eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Fragmentlängen und den Laufstrecken der DNAs im Gel, sowie ähnliche elektrophoretische Mobilität zwischen denaturierter DNA und RNA vorausgesetzt (Wu *et al.*, 1984; Hillen *et al.*, 1984). Transkribiert man *Hpa*II und *Sau* 3A fragmentierte *M. luteus* DNA in analoger Weise mit beiden Enzymspezies, so erhält man wieder nur bei der *M. luteus* Polymerase deutliche Transkripte charakteristischer Länge vor einem dunklen Hintergrund (ohne Beleg).

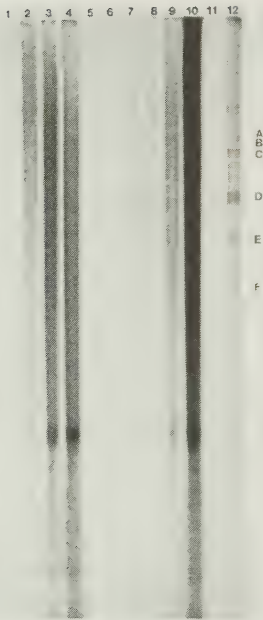


Fig. 14
Transkription Alu I -fragmentierter zellulärer M. luteus DNA in Abhängigkeit von Enzym- und DNA-Konzentration

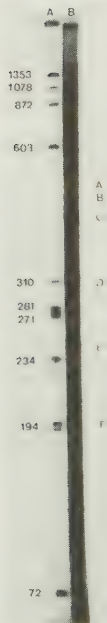


Fig. 15
Bestimmung der Transkriptlängen von Alu I fragmentierter genomischer M. luteus DNA

Spur A: DNA-Längenstandard (5'-³²P-markierte ϕ x174/HaeIII RF DNA)

Spur B: Spezifische Transkripte A-F der M. luteus Polymerase

zu Fig. 14

Spur 1:	<u>E. coli</u> RNA Polymerase	(0,02 mg/ml Enzym; 0,04 mg/ml DNA)
Spur 2:	<u>E. coli</u> RNA Polymerase	(0,2 mg/ml Enzym; 0,04 mg/ml DNA)
Spur 3:	<u>E. coli</u> RNA Polymerase	(0,5 mg/ml Enzym; 0,04 mg/ml DNA)
Spur 4:	<u>E. coli</u> RNA Polymerase	(1,6 mg/ml Enzym; 0,04 mg/ml DNA)
Spur 5:	<u>M. luteus</u> RNA Polymerase	(0,02 mg/ml Enzym; 0,04 mg/ml DNA)
Spur 6:	<u>M. luteus</u> RNA Polymerase	(0,2 mg/ml Enzym; 0,04 mg/ml DNA)
Spur 7:	<u>M. luteus</u> RNA Polymerase	(0,5 mg/ml Enzym; 0,04 mg/ml DNA)
Spur 8:	<u>M. luteus</u> RNA Polymerase	(1,6 mg/ml Enzym; 0,04 mg/ml DNA)
Spur 9:	<u>E. coli</u> RNA Polymerase	(0,5 mg/ml Enzym; 0,01 mg/ml DNA)
Spur 10:	<u>E. coli</u> RNA Polymerase	(0,5 mg/ml Enzym; 0,1 mg/ml DNA)
Spur 11:	<u>M. luteus</u> RNA Polymerase	(0,5 mg/ml Enzym; 0,01 mg/ml DNA)
Spur 12:	<u>M. luteus</u> RNA Polymerase	(0,5 mg/ml Enzym; 0,1 mg/ml DNA)

Die RNA-Synthese wurde in einem Gesamtvolumen von 125 μ l, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Die Transkripte wurden in einem 4%igen Polyacrylamidgel, das 8 M Harnstoff enthält, aufgetrennt.

Weitere Erläuterungen siehe Text.

zu Fig. 15

Die RNA-Synthese wurde mit folgenden Modifikationen (vergl. Methodenteil) in einem Transkriptionsansatz von 125 μ l durchgeführt: Die Salzmischung enthielt anstatt 0,16 mM UTP nur 0,05 mM UTP. Außerdem wurde 20μ Ci [α - 32 P]UTP anstatt 10μ Ci Radioaktivität eingesetzt. Die Inkubationszeit bei 37°C betrug anstatt einer, sieben Stunden. Protein- und DNA-Konzentration siehe Fig. 14 Spur 6. Die Transkripte wurde in einem 4%igen denaturierenden Harnstoffgel aufgetrennt.

Weitere Erläuterungen siehe Text.

Um auszuschließen, daß dieser Unterschied in der Transkriptionsselektivität *Alu I* hydrolysierter DNA auf einem Konzentrationseffekt beruht, wurde im folgenden Experiment die Polymerase-Konzentration bei gleichbleibender DNA-Konzentration variiert (Fig. 14). Wie in Fig. 14 Spur 7 und 8 zu sehen ist, synthetisiert die *M. luteus* Polymerase die untersuchten Transkripte bei einer Protein-Konzentration von 0,5 - und 1,6 mg/ml mit gleicher Intensität, während diese bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml Protein (Spur 6) andeutungsweise und bei 0,02 mg/ml Enzym (Spur 5) nicht mehr zu beobachten sind. Analysiert man die *E. coli* RNA Polymerase in analoger Weise, so kann bei keiner Enzym-Konzentration ein Transkript festgestellt werden (Spur 1-4). Es fällt auf, daß bei beiden Enzymspezies die Stärke der Schwarzfärbung in ähnlicher Weise zunimmt, wie die Proteinkonzentration erhöht wird (Spur 1, 2, 3, 5, 6, 7). Bei 1,6 mg/ml Enzym ist wie im Falle der spezifischen *M. luteus* Transkripte (Spur 7 und 8) keine Erhöhung der Intensität der Schwarzfärbung mehr zu beobachten. Wiederholt man das Experiment mit konstanter Enzymkonzentration (0,5 µg/ µl Fig. 14) und variiert die DNA-Konzentration, so beobachtet man wiederum nur bei dem *M. luteus*-Enzym diese spezifischen RNAs (Spur 7, 11, 12). Es ist interessant, daß bereits bei einer geringen DNA-Konzentration von 0,01 mg/ml diese Transkripte, -wenn auch schwach-, in der Autoradiographie zu sehen sind (Spur 11). Bei 0,04 -und 0,12 mg/ml DNA im Transkriptionsansatz (Spur 7 und 12) erscheint die Intensität der untersuchten Transkripte gleichbleibend.

Die Frage, ob die *M. luteus* Transkripte A bis F in Fig. 15 keine Artefakte der experimentellen Bedingungen darstellen, sondern von definierten *Alu I*-Fragmenten spezifisch initiiert werden, kann durch Hybridisierung dieser RNAs an *Alu I* hydrolysierter genomischer DNA (Southern, 1975) beantwortet werden. Dabei wurde von folgender Überlegung ausgegangen: Die an *Alu I* fragmentierter zellulärer DNA synthetisierten Transkripte A bis F sollten nur mit den DNA-Fragmenten hybridisieren, die den jeweiligen Promotor und einen zur Hybridisierung ausreichenden DNA-Abschnitt aufweisen. Es sollten sich demnach bei der nachfolgenden Autoradiographie ein definiertes Bandenmuster ergeben. Zu diesem Zweck wurde die vollständig mit

Alu I hydrolysierte M. luteus DNA in einem hochprozentigen Agarosegel aufgetrennt, mit Alkali denaturiert und nach Neutralisierung auf Nitrozellulosepapier überführt und gegen elektrophoretisch gereinigte RNA C hybridisiert. In analoger Weise wurde mit RNA D, RNA E und RNA F verfahren. Auf die Analyse der RNA A und B wurde verzichtet, da sich diese relativ langen Transkripte nur mit großem Verlust aus einem Polyacrylamidgel eluieren lassen und folglich bedingt durch ihre geringe Konzentration in der Autoradiographie nur schwache Signale erwarten lassen.

Das Ergebnis der Autoradiographie bestätigt die zuvor angestellten Überlegungen (Fig. 16). Alle einzeln untersuchten RNAs hybridisieren mit mindestens acht DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge im genomischen Blot. Es ist überraschend, daß alle Transkripte ein nahezu identisches Hybridisierungsmuster zeigen. Eine Möglichkeit, diesen Befund zu erklären, wäre, daß M. luteus die Gene für diese starken Transkripte in mindestens achtfacher Kopienzahl besitzt. In der Tat wurden in E. coli multiple Gene kartiert. So enthält beispielsweise das E. coli-Chromosom sieben ribosomale Operons (Glaser et al., 1983). Eine andere Möglichkeit wäre, daß es aufgrund des hohen dCdG-Gehaltes der M. luteus DNA zu Kreuzhybridisierung mit homologen, nicht sequenzgleichen Fragmenten kommt. Denkbar wäre auch, daß die Hydrolyse mit Alu I nicht vollständig verlaufen ist.

Die Experimente zeigen klar, daß die M. luteus RNA Polymerase an fragmentierter zellulärer DNA im Gegensatz zum E.coli Enzym selektiv starke Transkripte synthetisieren kann. Da jedoch an der Stelle im Gel, in der die starken M. luteus Transkripte wandern, bei der Reaktion mit E. coli-Enzym ebenfalls, bedingt durch mögliche RNA-Synthese, Schwärzung in der Autoradiographie beobachtet wird, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß auch diese Polymerase die M. luteus spezifischen RNAs synthetisieren kann, -wenngleich mit sehr viel geringerer Syntheserate.

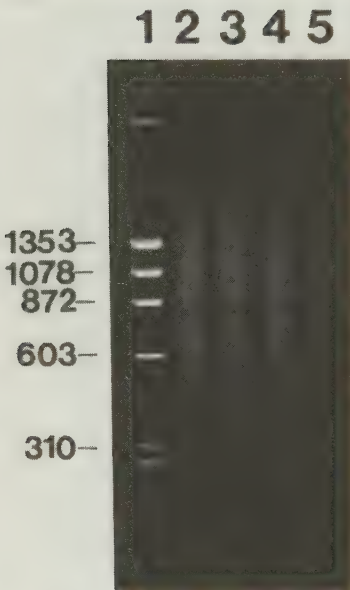


Fig. 16
Hybridisierung von spezifischen *M. luteus* Transkripten an Alu I fragmentierter zellulärer *M. luteus* DNA nach Southern (1975)

1 2 3 4

oben: zelluläres Alu I -Fragmentgemisch nach Auftrennung in einem 1,4%igen Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Spur 1 : DNA-Längenstandard (ϕ X174 DNA/HaeIII)
Spur 2-5: 5µg Alu I hydrolysierte zelluläre *M. luteus* DNA

unten: Hybridisierungsmuster der an Alu I fragmentierter genomischer DNA abgelesenen Transkripte an Alu I hydrolysierte *M. luteus* DNA.
Spur 1: RNA C; Spur 2: RNA D; Spur 3: RNA E;
Spur 4: RNA F.

- Spur 1: RNA C geblottet auf Spur 2 (Bild oben)
- Spur 2: RNA D geblottet auf Spur 3 (Bild oben)
- Spur 3: RNA E geblottet auf Spur 4 (Bild oben)
- Spur 4: RNA F geblottet auf Spur 5 (Bild oben)

zu Fig. 16

Fünf Mikrogramm Alu I hydrolysierten genomischen *M. luteus* DNA wurde in Gegenwart von Ethidiumbromid in einem 1,4%igen horizontalen Agarosegel bei einer Spannung von 5 V/cm durch Elektrophorese aufgetrennt und durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Denaturierung, Neutralisation und Überführung der DNA auf Nitrozellulosepapier (Schleicher und Schüll) erfolgte wie bei Maniatis *et al.* (1982) auf Seite 382 beschrieben, mit der Ausnahme, daß die DNA unter Atmosphärendruck bei 80°C auf dem Nitrocellulosepapier fixiert wurde. Die durch *in vitro* RNA-Synthese erzeugten RNAs C bis F (siehe Fig. 15) wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und entsprechenden Positionen im Gel zugeordnet. Ein etwa 3mm breiter Streifen, der jeweils ein Transkript enthielt, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und zerkleinert. Die RNA wurde in 2ml 4 x SSC-Puffer, der 50% Formamid enthielt, über Nacht bei 30°C unter Schütteln eluiert und durch 15minütige Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge von störenden Gelstücken befreit. Die Flüssigkeit (Hybridisierungslösung) wurde nach Hitzedenaturierung (15 Minuten auf 65°C erhitzt, dann in Eiswasser abgeschreckt) zusammen mit dem zuvor in 6 x SSC-Puffer gewässerten Nitrocellulosefilter in eine Plastiktüte verschweißt und für 3 Tage bei 42°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde der Filter in 300 ml 0,5 x SSC-Puffer gewaschen, sodann 1 Stunde bei Raumtemperatur in 200 ml 2 x SSC-Puffer, der 10µg/ml hitzebehandelte RNase A enthielt, geschüttelt und anschließend 3 x 15 Minuten bei 65°C in 200 ml 0,5 x SSC-Puffer unter Schütteln inkubiert. Der Filter wurde an der Luft getrocknet und durch Autoradiographie ausgewertet. 1 x SSC-Puffer: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat pH 7,0.

Klonierung der Gene für die starken Transkripte

Gewinnung der Genbank

Als Vektor für die Genbank wählte ich den *E. coli* Phagen λ EMBL3A⁺ (Frischauf et al., 1983), der eine nicht genauer charakterisierte Mutante des Phagen λ EMBL3A darstellt (Hartl, 1984). Dieser Substitutionsvektor, der eine Klonierungskapazität von 9-23 kBp DNA besitzt, bietet im Vergleich zu anderen Lambda-Vektoren einige Vorteile:

Zur biologischen Sicherheit wurden zwei Amber-Mutationen in den Genen A und B des Phagen eingeführt, der daher nur auf supF-haltigen Wirtsstämmen wachsen kann, die unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen. Sein für die Phagenvermehrung nicht essentielles und durch Fremd-DNA substituierbares Mittelstück ist an beiden Enden durch einen Polylinker mit den Lambda-Armen verknüpft. Der Polylinker enthält bei λ EMBL3A⁺ die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Sal I-Bam H I-Eco R I und ist bezüglich des Mittelstückes spiegelbildlich angeordnet (Fig. 17). Im Gegensatz zu anderen Lambda-Substitutionsvektoren muß bei λ EMBL3A⁺ das Mittelstück nicht durch aufwendige Gradientenzentrifugation von den für den Lebenszyklus notwendigen Armen abgetrennt werden, denn die Hydrolyse der DNA mit den Restriktionsenzymen Eco R I und Bam H I liefert ein von Eco R I-Enden flankiertes Mittelstück, das nicht mit den durch Bam H I und Cos-Sequenz begrenzten Lambda-Armen ligierbar ist. Diese biochemische Selektion, die sich gegen die Neubildung des Vektors richtet und in Anwesenheit des Mittelstückes zu klonieren erlaubt, kann noch in ihrer Effizienz gesteigert werden, wenn die Bam H I/Eco R I fragmentierte DNA mit Isopropanol gefällt wird. Dabei werden die λ -Arme und das Mittelstück gefällt, während das nur wenige basenpaar lange Bam H I-Eco R I-Polylinkerfragment in der Lösung zurückbleibt. Nach Abspaltung des Mittelstückes können DNA-Fragmente mit Bam H I-kompatiblen Enden in die Bam H I-

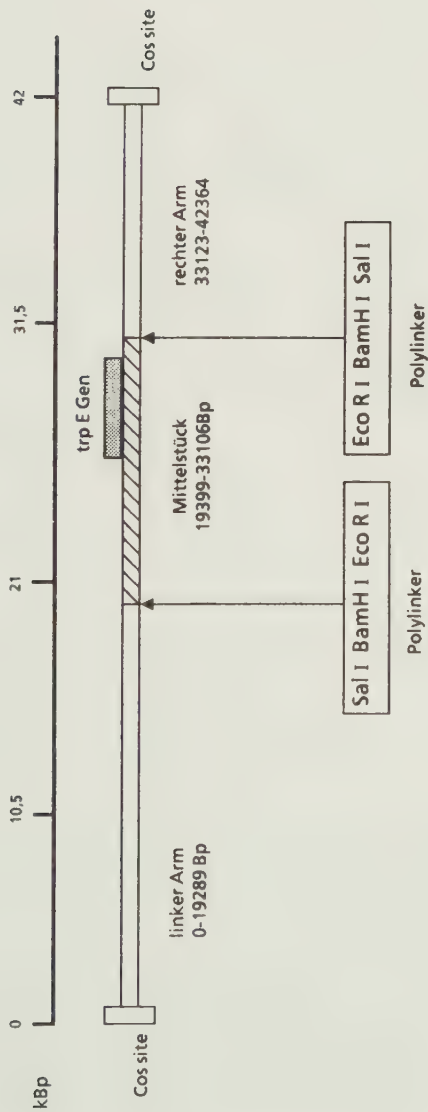


Fig. 17 Vereinfachte Darstellung nach Frischaut et al. (1983) der Restriktionskarte von λ EMBL 3 aus dem Informationsblatt zu λ EMBL 3 und λ EMBL 4 der Fa. Promega Biotec. (ohne Jahr)

Stellen des Vektors ligiert und anschließend vollständig durch Sal I - Verdauung wiedergewonnen werden

Zur Erstellung einer genomischen Genbank spielt die Art und Weise, wie die zelluläre DNA fragmentiert wurde, eine entscheidende Rolle. Zunächst sollte sie durch limitierte Restriktionsverdauung mit einem Restriktionsenzym mit Tetranukleotid-Erkennungssequenz hydrolysiert werden. Damit wird erreicht, daß die Genbank aus statistisch überlappenden DNA-Fragmenten aufgebaut wird. Dies ermöglicht nicht nur die Analyse einzelner Gene, sondern auch deren nähere und weitere Umgebung. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit, daß DNA-Sequenzen in der Genbank wiedergefunden werden können.

Zunächst wurde in einem Vorversuch die optimale Einwirkzeit des Restriktionsenzym Mbo I (Biolabs) auf die hochgereinigte M. luteus DNA bestimmt, welche Restriktionsfragmente zwischen 15 und 20 kbp liefert (Fig. 18). Dazu wurde eine konstante Menge an Mbo I (10 Units) und DNA (10 µg) bei 37°C (in einem Gesamtvolumen von 0,08 ml) verdaut, wobei in Abständen von jeweils zehn Minuten Aliquots entnommen wurden, die anschließend in der Gelelektrophorese untersucht wurden. Nach 30minütiger Inkubation scheint die DNA in dem gewünschten Größenbereich vorzuliegen. Für den präparativen Ansatz wurden sämtliche Werte versiebenfacht und die DNA für 30 Minuten bei 37°C hydrolysiert. Nach Auftrennung der DNA in einem niederprozentigen Agarosegel wurde ein Gelstreifen, der DNA-Fragmente zwischen 15 und 20 kbp enthielt, aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus diesem elektroeluiert (Maniatis et al., 1982). Um eine andere statistische Verteilung von Fragmenten zu bekommen, wurde in einem Parallelansatz unter identischen Bedingungen die Einwirkzeit des Enzyms um zehn Minuten verlängert, da unter diesen Bedingungen ebenfalls DNA-Fragmente der gewünschten Größe noch zu sehen sind (Fig. 18). Die beiden Fragmentgemische wurden vereinigt, mit alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) behandelt und anschließend mit vollständig BamH I -Eco R I -verdautem Vektor (λEMBL3A⁺) über Nacht mit Phagen

T4-Ligase inkubiert. In einem Kontrollexperiment wurde unter identischen Bedingungen dieselbe Menge an Vektor DNA ohne M. luteus DNA ligiert. Vergleicht man beide Ansätze vor und nach der Ligasereaktion, so beobachtet man in der Gelelektrophorese in beiden Fällen hochmolekulare DNA, die nur durch die Einwirkung der DNA-Ligase entstehen kann (ohne Beleg). Von beiden Ligasansätzen wurden 0,84 µg DNA-Portionen direkt durch Zugabe der E. coli-Lysate SE (Sonic-Extract) und FTL (Freeze-thaw-lysate) in vitro verpackt (Hohn, 1979; vergl. Hartl, 1984). Insgesamt wurden 28000 Plaques erhalten.

Es wurden $4,3 \times 10^5$ pfu aus einem Mikrogramm vor der Ligasereaktion eingesetzten M. luteus Fragment DNA und $1,3 \times 10^2$ pfu pro Mikrogramm der Kontroll-DNA erhalten. Dieser Leerwert kommt sowohl durch Neubildung des Vektors nach der Ligasereaktion, als auch durch die in den Lysaten endogen enthaltende DNA zustande, die mit der exogenen rekombinanten DNA kompetitiert.

Um zu zeigen, daß diese Phagen wirklich rekombinante DNA enthalten, wurde aus zehn beliebig ausgewählten Klonen die DNA mittels Schnellaufschluß isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sal I gespalten, das nicht die Vektorarme angreift. Wie Fig. 19 zeigt, erhält man für alle untersuchten Klone ein unterschiedliches Restriktionsmuster, was auf unterschiedliche Herkunft der Insert-DNA schließen läßt. Die beiden DNA Fragmente, die bei allen Klonen in jeder Spur vorhanden sind (außer Spur a und m) und die geringste Mobilität im Gel aufweisen, sind die beiden Vektorarme. Alle anderen Fragmente sind Sal I -Fragmente der rekombinanten DNA.

Wenn man annimmt, daß das Molekulargewicht von M. luteus ungefähr dem von E. coli mit 4200 kbp (Ditta et al., 1980) entspricht, kann aus der Formel $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$ (Clarke und Carbon, 1976) errechnet werden, daß bei 2146 Phagen eine 99% Chance besteht, daß eine nur einmal im Genom vorkommende DNA-Sequenz in dieser Phagengenbank vertreten ist. Dabei ist N die Anzahl der Klone, P die gewünschte Wahrscheinlichkeit, f das Größenverhältnis Insertion zu Gesamtgenom. Bei der Berechnung wurde von einer minimalen Insertgröße von 9 kbp ausgegangen, die gerade noch in λ EMBL3A+

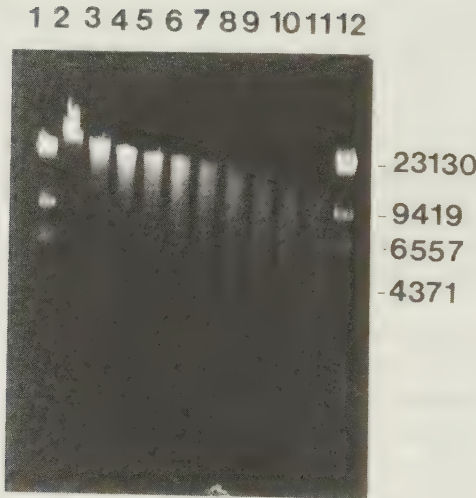


Fig. 18

Bestimmung der Bedingungen für die partielle Hydrolyse von hochmolekularer M. luteus DNA mit Mbo I

Spur 1 und 12: DNA-Längenstandard (λ /HindIII-DNA)

Spur 2: M. luteus DNA unbehandelt

Spur 3-11 Aliquots von M. luteus DNA nach Reaktion mit Mbo I nach 10 (Spur 3); 20 (Spur 4); 30 (Spur 5); 40 (Spur 6); 50 (Spur 7); 60 (Spur 8); 70 (Spur 9); 80 (Spur 10) und 90 Minuten (Spur 11).

zu Fig. 18

In diesem Experiment wurden 10 μ g M. luteus DNA mit 10 Units Mbo I (Biolabs) bei einem Gesamtvolumen von 0,08 ml für 90 Minuten bei 37°C hydrolysiert. In 10minütigen Abständen wurden Aliquots entnommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA-Lösung (Endkonzentration 0,01 M) beendet. Die Proben wurden bis zu ihrer Analyse in einem 0,5%igen Agarosegel bei 0°C aufbewahrt. Die Hydrolysebedingungen, welche die größte Anzahl von DNA-Fragmenten in einem Größenbereich zwischen 15 - 20 kbp ergaben, wurden durch die Stärke der Intensität der Fluoreszenz bestimmt.

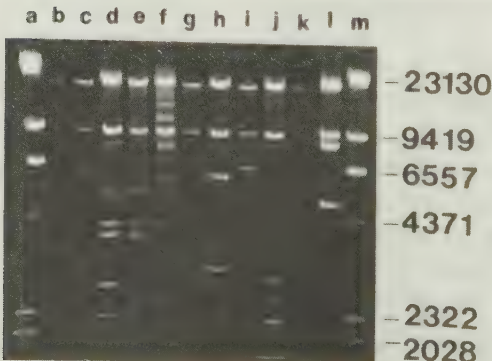


Fig. 19

Analyse der M. luteus Genbank mit Sal I

Spur a und m: DNA-Längenstandard (λ /HindIII-DNA)

Spur b-k: Sal I-hydrolysierte Lambda-DNAs aus zehn beliebig ausgewählten Lambda-Plaques.

Spur l: Vektor-DNA mit Sal I gespalten

Weitere Erklärungen im Text

verpackt werden kann. Insertionen kleiner 9 kBp, oder nur die Vektorarme führen nach Ligierung zu Molekülen, die nicht mehr verpackt werden können, da der Abstand zwischen den Cos-Stellen unter 35 kBp gesunken ist.

Identifizierung der Klone

Die DNA etwa 2 000 ausplattierter rekombinanter Phagen aus der Genbank wurde auf Nitrozellulosepapier (Benton und Davis, 1977) überführt und gegen gelelektrophoretisch gereinigte ^{32}P -markierte RNAs C-E (vergl. Fig. 15) hybridisiert. Die Analyse der Klone ergab etwa 200 schwache und ca. 30 deutlichere Signale in der Autoradiographie. Um auszuschließen, daß diese 30 Klone Hybridisierungsartefakte darstellen, wurden sie nochmals mit derselben RNA-Probe hybridisiert. Dazu wurden diese Phagen, zusammen mit λEMBL3A^+ -Phagen als Kontrolle aus einer Stammlösung in einer gittermäßigen Anordnung auf *E. coli* K803 Bakterienrasen getupft, über Nacht vermehrt, auf Nitrozellulosepapier übertragen und hybridisiert. Nach diesem Schritt zeigten sechs Klone sehr starke und 14 Klone geringe Schwärzung in der Autoradiographie (Fig. 20). Für die restlichen zehn Phagen, als auch für die Kontrolle (λEMBL3A^+) konnten keine Signale beobachtet werden. Die sechs stark hybridisierenden Klone erhielten die Bezeichnung $\lambda 6$, $\lambda 7$, $\lambda 8$, $\lambda 12$, $\lambda 13$ und $\lambda 16$.

Zur weiteren Charakterisierung der Klone $\lambda 6$, $\lambda 7$, $\lambda 13$ und $\lambda 16$ wurde deren DNA mittels Schnellaufschluß isoliert, mit Sal I geschnitten und in der Gelelektrophorese aufgetrennt (Fig. 21). Da dieses Restriktionsenzym im Polylinker-Bereich des Vektors λEMBL3A^+ schneidet, erhält man die beiden Vektorarme und durch Sal I -Enden flankierte Insert-DNA-Fragmente. Die einzelnen Insert-Fragmentgrößen der untersuchten Klone, als auch deren Summe habe ich in Tab. 2 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß bestimmte Sal I -Fragmente zugleich in mehreren Klonen repräsentiert sind, während andere nur in einzelnen Klonen vertreten sind.

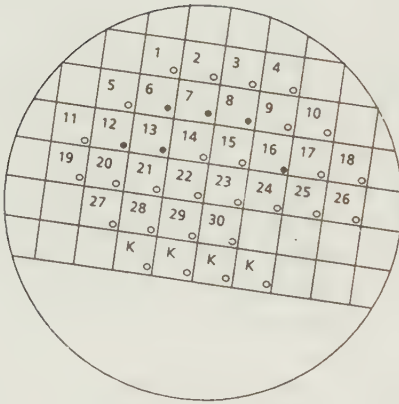
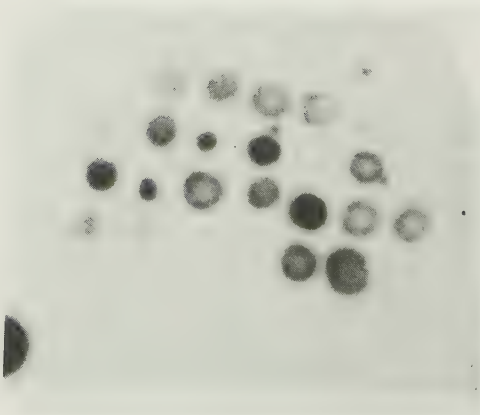


Fig. 20
Plaquehybridisierung vorselektionierter λ -Klone mit spezifischen M. luteus Transkripten als Probe

oben:
Schematische Orientierung von 30 vorselektionierten λ -Plaques (Erklärung im Text) auf der "Master-Platte" (0). Plaques, die sehr starke Hybridisierung zeigten (●) wurden nach ihrer Position benannt (λ 6, λ 7, λ 8, λ 12, λ 13, λ 16). Plaques des Vektors (k) ergaben keine Signale.



unten:
Autoradiographie des Filters.

Erklärung im oberen Teil der Figur.

zu Fig. 20

Auf eine trockene L-Broth-Platte wurde 3 ml 50°C warme autoklavierte Oberagarose (0,5% Agarose, 10 mM $MgSO_4$), die zuvor mit 100 μ l einer Infektionskultur des *E. coli* Stammes K803 vermischt wurde gegossen und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit Hilfe einer sterilen Impfose Phagen aus einer Phagenstocklösung in gittermäßiger Anordnung auf die erstarrte Oberagarose getupft und für 14 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Überführung der λ -DNAs auf Nitrocellulosefilter, sowie deren Denaturierung und Neutralisierung wurde wie in Maniatis et al. (1982) auf Seite 320 beschrieben, durchgeführt. Die DNA wurde durch Inkubation für zwei Stunden bei 80°C auf dem Filter fixiert. Zur Hybridisierung wurde der Filter mit 7ml Hybridisierungslösung ($2,8 \times 10^5$ cpm/ml; vergl. Legende zu Fig. 16) getränkt und für 3 Tage bei 42°C hybridisiert. Danach wurde der Filter in 300 ml 2 x SSC-Puffer zweimal bei 37°C für 30 Minuten gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC-Puffer, der 20 μ g/ml hitzebehandelte Ribonuklease A enthielt, unter Schütteln inkubiert. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen entsprachen den Empfehlungen des Herstellers des Nitrocellulosefilters (Schleicher und Schüll, 1983). Der Filter wurde an der Luft auf Filterpapier getrocknet und durch Autoradiographie ausgewertet. 1 x SSC-Puffer: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat. Die Präparation von Bakterien zur Phagenvermehrung als auch die Anlage einer Phagenstocklösung sind in Maniatis et al. (1982) auf Seite 63 und 65 beschrieben.

Klon	$\lambda 6$	$\lambda 7$	$\lambda 13$	$\lambda 16$
	4370	4370		
			4000	4000
Sal I Insert-Fragmente (Bp)		3550		3550
		3130	3130	
			2850	
	2040	2040	2040	2040
				1820
	1720			
	1420			
	1230		1230	1230
	910	910	910	
		560		
	550	550		550
	500	500		500
Summe:	12740	14140	14720	14600

Tab. 2 Bestimmung der Insertfragmentgrößen rekombinanter vorselektionierter Phagen-DNAs aus der Genbank

Die Längen der Sal I-Insert DNAs wurden mittels DNA-Längenstandards aus Fig. 21 errechnet. Erklärung im Text.

Die Southernblot-Analyse dieser Klone, mit radioaktiv-markierter RNA C-F als Probe, ergibt in der Autoradiographie folgendes Bild:

Unter den verwendeten Bedingungen hybridisiert bei den Klonen $\lambda 13$ und $\lambda 16$ ein gemeinsames 4 kBp Sal I -Fragment, großer Intensität (Fig. 22). Die restlichen Insert-Fragmente aller untersuchten Klone ergeben unter diesen Bedingungen im Vergleich nur geringe Signale. Dazu möchte ich einige Anmerkungen machen. Bei einer Southernblot-Analyse spielen neben der Länge der RNA-Probe, Hybridisierungsbedingungen und Waschbedingungen eine entscheidene Rolle. So steigt die Selektivität einer RNA-Probe zu einer homologen, einzelsträngigen und an das Nitrozellulosefilter gebundenen DNA an,

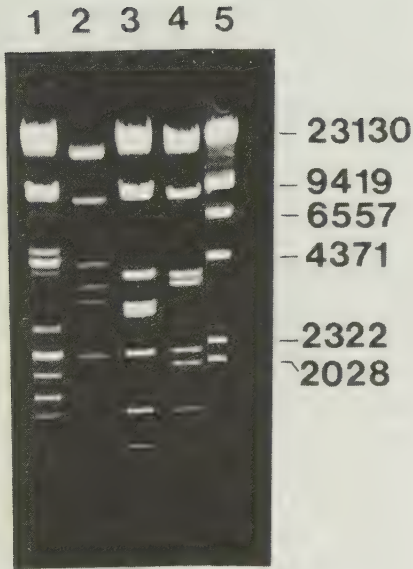


Fig. 21

Analyse rekombinanter Lambda-DNAs durch Hydrolyse mit SAL I

Spur 1: λ 6/Sal I

Spur 2: λ 7/Sal I

Spur 3: λ 13/Sal I

Spur 4: λ 16/Sal I

Spur 5: DNA-Längenstandard
(λ /HindIII, Biolabs)

Die DNAs wurden durch Schnellaufschluß isoliert, mit Sal I hydrolysiert und in einem 0,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Hydrolyse von λ 6 mit Sal I verlief unvollständig.

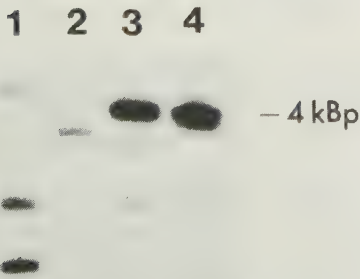


Fig. 22

Hybridisierung von in vitro Transkripten an rekombinante Sal I-hydrolysierte λ -DNAs nach Southern (1975)

Spur 1: λ 6/Sal I

Spur 2: λ 7/Sal I

Spur 3: λ 13/Sal I

Spur 4: λ 16/Sal I

zu Fig. 22

Die rekombinanten Sal I-hydrolysierten DNAs von Fig. 21 wurden auf Nitrocellulosepapier überführt und fixiert, wie in Legende zu Fig. 16 und Maniatis *et al.* (1982) beschrieben. Die durch *in vitro* Transkription synthetisierten RNAs C bis F (siehe Fig. 15) wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht, aus dem Polyacrylamidgel eluiert und gegen die auf dem Filter fixierten Sal I hydrolysierten Lambda-DNAs hybridisiert (72 Stunden bei 42°C), wie in Legende zu Fig. 16 beschrieben. Danach wurde der Filter in 300 ml 0,5 x SSC-Puffer gewaschen, sodann 1 Stunde bei Raumtemperatur in etwa 200 ml 2 x SSC-Puffer der 10 µg/ml hitzebehandelte RNase A enthielt geschüttelt und anschließend 3 x 15 Minuten bei 75°C in 200 ml 0,1 x SSC-Puffer unter Schütteln inkubiert. Der Filter wurde auf Whatman-3MM-Papier an der Luft getrocknet und durch Autoradiographie ausgewertet. 1 x SSC-Puffer: 0,15 M NaCl; 0,015 M Na-Citrat pH 7,0.

wenn entweder die Waschtemperatur erhöht oder die Ionenstärke der Waschlösung erniedrigt wird. Unter extremen Waschbedingungen sollten demnach nur sequenzgleiche DNA-RNA-Hybride am Filter gebunden bleiben, während sequenzhomologe und unspezifische Hybride eluiert werden. So erhält man beispielsweise sehr starke Signale und nur wenig unspezifische Hybridisierung, wenn der Filter bei 65°C in einem Puffer mit geringer Ionenstärke (0,5 x SSC) gewaschen wird. (Schleif und Wensink, 1981). Diese Bedingungen gelten jedoch nur für DNA-RNA-Hybride mit einem dGdc-Gehalt von etwa fünfzig Prozent und nicht für die hier verwendete M. luteus DNA (72% dCdG); da unter diesen Bedingungen alle Insert-Fragmente hybridisieren (ohne Beleg). Deshalb habe ich die Waschtemperatur auf 75°C erhöht und gleichzeitig die Ionenstärke der Pufferlösung auf ein Fünftel des vorherigen Wertes erniedrigt. Unter diesen Bedingungen hybridisieren nur die genannten Fragmente mit großer Intensität, während die restlichen nur andeutungsweise zu sehen sind. Diese Resthybridisierung kann außer durch noch unspezifische Hybridisierung auch durch RNAs verursacht sein, die bei der Isolierung der spezifischen RNAs aus dem Gel miteluiert werden. Da das 4 kBp Sal I Fragment der Klone λ 13 und λ 16 die stärkste Hybridisierung zeigt, sollte diese DNA die Sequenzen für die starken Transkripte enthalten.

Um genügende Mengen an Fragment DNA zu bekommen, wurde das 4 kBp Sal-Fragment der Klone λ 13 und λ 16 in die Sal I -Stelle des E. coli Plasmidvektors pUC 8 (Vieira und Messing, 1982) umklontiert.

Wie zuvor erwähnt, wurde die Genbank aus überlappenden DNA-Fragmenten konstruiert. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß das 4 kBp Sal I -Fragment von λ 13 und λ 16 sequenzgleich in beiden Klonen enthalten ist. Um dies zu prüfen, wurde das entsprechende Fragment gelelektrophoretisch isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen HpaII, Alu I und HaeIII verdaut. Das Ergebnis dieses Experiments bestätigt die Vermutung. Alle verwendeten Enzyme erzeugen bei beiden 4 kBp Sal I -Fragmenten ein identisches Restriktionsmuster (Fig. 23).

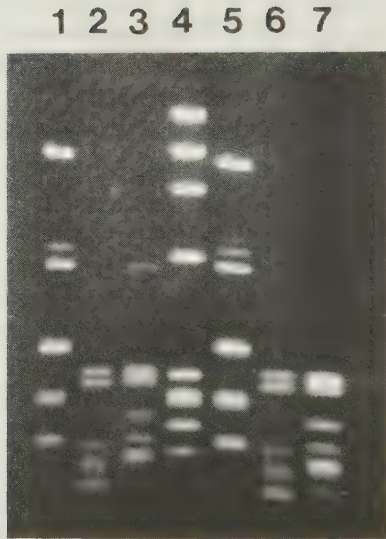


Fig. 23

Gelanalyse des 4 kbp Sal I -Fragments der Klone λ 13 und λ 16 durch Hydrolyse mit Alu I , HaeIII und HpaII

Spur 1: λ 13/Alu I ;

Spur 2: λ 13/HaeIII;

Spur 3: λ 13/HpaII;

Spur 4: DNA-Längenstandard (ϕ X174 RF DNA/ HaeIII);

Spur 5: λ 16/Alu I ;

Spur 6: λ 16 HaeIII;

Spur 7: λ 16/HpaII

Die Fragmentgemische wurden in einem 1,6%igen Agarosegel aufgetrennt.

In vitro Transkription der klonierten DNA

Zunächst galt es zu untersuchen, ob die M. luteus RNA Polymerase an ihrer klonierten nativen Matrize ebenso prominente Transkripte in vitro initiieren kann, wie an fragmentierter zellulärer M. luteus DNA. Dazu wurde das 4 kBp Sal I -Fragment durch Agarosegelelektrophorese isoliert und in sechs Parallelansätzen mit den Restriktionsenzymen HaeIII, HpaII, Fnu 4H I , Alu I , Rsa I und Taq I hydrolysiert. Dadurch wurde ein Fragmentgemisch heterogener Länge erzeugt, das für die in vitro RNA Synthese als Matrize eingesetzt werden sollte. Mit dieser Prozedur wurden zwei Ziele verfolgt:

Einmal sollte durch das Verwenden von sechs Restriktionsenzymen verhindert werden, daß bei der Verdauung der DNA bestimmte, für die Transkriptionsinitiation essentielle Sequenzen zerstört werden. Gleichzeitig würde durch die Verwendung von Enzymen mit Tetranukleotidsequenz erreicht, daß kleine DNA-Fragmente entstehen, die als Matrize in der Transkription die Synthese kurzer, leicht in denaturierenden Polyacrylamidgelen analysierbarer Abbruchtranskripte dirigieren.

Transkribiert man jedes dieser DNA-Gemische unter identischen Bedingungen mit M. luteus RNA Polymerase in Gegenwart von α -³²P-markiertem UTP, so ergibt sich in der Autoradiographie folgendes Bild (Fig. 24): Nur bei der mit HpaII, Fnu4HI, RsaI und TaqI fragmentierten DNA entstehen in jedem Fall diskrete, deutliche Transkripte unterschiedlicher Länge und Intensität. Dagegen werden bei der Reaktion mit Alu I und HaeIII fragmentierter DNA keine oder nur andeutungsweise RNAs beobachtet. Diese Befunde deuten darauf hin, daß in der Tat durch Alu I (AG*CT) und HaeIII (GG*CC) für die RNA-Synthese wichtige Kontrollbereiche zerstört wurden. Es fällt auf, daß im Gegensatz zu E. coli Matrizen bei der Transkription an M. luteus DNA auf der Gelauftragstelle kein unspezifisches Produkt zu sehen ist (Ernst,

1981; Brack, 1983), was auf eine hohe Spezifität der M. luteus Polymerase gegenüber der nativen Matrize schließen läßt.

Bei der Transkription an E. coli DNA mit M. luteus und E. coli Polymerasen wurden Promotoren mit entgegengesetzter Enzymspezifität entdeckt. Dabei scheinen Promotoren mit hohem dCdG-Gehalt von M. luteus Polymerase bevorzugt zu werden, was sich durch die deutlich höhere Syntheserate der RNAs ausdrückt. Diese Ergebnisse sollten demzufolge besonders für die dCdG-reiche M. luteus DNA gelten. Dazu wurde unter identischen Bedingungen Taq I verdautes 4 kBp Sal I-Fragment mit beiden Polymerasen transkribiert und radioaktive Produkte in der Autoradiographie sichtbar gemacht (Fig. 25). Ebenso wie in Fig. 24 wird auch diesmal wieder ein etwa 440 N langes, prominentes Transkript (A) beobachtet, welches von beiden Enzymen synthetisiert wird. Es fällt auf, daß das M. luteus-Enzym diese RNA nahezu als einziges Produkt sehr intensiv katalysiert, während die E. coli Polymerase das 440 N lange Transkript kaum synthetisiert. Um das Verhältnis der Syntheseraten quantitativ zu erfassen, wurden die RNA-Banden des 440 N langen Transkripts aus dem Gel ausgeschnitten und die inkorporierte Radioaktivität anhand der Cerenkov-Strahlung gemessen (Tab. 3). Aus den Werten geht hervor, daß die M. luteus RNA Polymerase unter diesen Bedingungen diese RNA mit wesentlich höherer Syntheserate katalysiert, als E. coli Polymerase.



Fig. 24

Transkription des klonierten, fragmentierten 4 kBp Sal I -Fragments durch M. luteus RNA Polymerase

Spur 1: Taq I ; Spur 2: Rsa I ; Spur 3: Alu I ; Spur 4: Fnu 4H I ; Spur 5: Hpa II ; Spur 6: Hae III ; Spur 7: DNA-Längenstandard (ϕx174 RF DNA/Hae III)

A: diskretes M. luteus Transkript

Weitere Erklärungen im Text



Fig. 25

Vergleichende Transkription des Taq I hydrolysierten 4 kBp Sal I -Fragments durch die RNA Polymerasen aus M. luteus und E. coli

Spur 1: M. luteus Enzym
Spur 2: E. coli Enzym

A: diskretes M. luteus Transkript

Weitere Erklärungen im Text

Einbau von [α - 32 P] UMP in die RNA				
Polymerase	Matrize	lpm gesamt	lpm Leerwert	lpm korrigiert
<u>M. luteus</u>	4kBp Sal I - Fragment/Taq I	3889	1224	2674
<u>E. coli</u>	4kBp Sal I - Fragment/Taq I	1604	1444	160

Tab. 3 Quantifizierung der Syntheseraten des Transkripts A aus Fig. 25 durch die RNA Polymerase aus M. luteus und E. coli

Um die relativen Syntheseraten zu quantifizieren, wurde nach der Gelelektrophorese (Fig. 25) ein etwa 1 cm breiter Streifen, der das Transkript enthielt, aus dem Gel ausgeschnitten und die Cerenkov-Strahlung gemessen (lpm gesamt). Als Leerwert (lpm Leerwert) wurde der mittlere Wert der Radioaktivität zweier direkt benachbarter und 1 cm breiter Gelstreifen bestimmt. Aus der Differenz der beiden Werte wurde die Radioaktivität des Transkripts (lpm korrigiert) errechnet.

Dementsprechend initiiert die M. luteus RNA Polymerase unter der Voraussetzung identischer Elongationsgeschwindigkeit die Synthese dieses 440 N langen Transkripts wesentlich effizienter als das homologe Enzym aus E. coli.

Wie weiter aus Fig. 25 hervorgeht, synthetisiert die E. coli RNA Polymerase außer dieser RNA noch weitere niedermolekulare RNAs mit großer Intensität, die von der anderen Enzymspezies nicht beobachtet werden. Dies bedeutet, daß sich die M. luteus und E. coli RNA Polymerase in der Selektivität als auch in der Intensität der Transkription an klonierter M. luteus DNA unterscheiden.

E.coli Promotoren in M. luteus DNA

Eine Möglichkeit, einen E. coli Promotor in M. luteus DNA zu isolieren besteht darin, hydrolysierte M. luteus DNA durch "Shotgun"-Klonierung in ein Promotor-Selektions-Plasmid wie pPV33 (West und Rodriguez, 1982) zu klonieren. Sollte sich auf einem dieser DNA-Fragmente ein E. coli Promotor in der richtigen Orientierung befinden, so würde seine Anwesenheit in E. coli-Zellen zu einer phänotypisch sichtbaren Tetracyclinresistenz führen. Dieses Experiment hatte zwei Ziele: Zum einen sollte die Frage beantwortet werden, ob in der sehr dCdG-reichen M. luteus DNA E. coli Promotoren, die sich durch ihren niedrigen dCdG-Gehalt auszeichnen, vorkommen. Zum anderen sollten definierte M. luteus DNA-Fragmente für spätere vergleichende in vitro Transkriptionsexperimente mit E. coli und M. luteus Polymerase isoliert werden.

"Shotgun"-Klonierung von verdauter M. luteus DNA

Mit dem Ziel, möglichst verschiedene niedermolekulare Fragmentgemische zu bekommen, wurde M. luteus DNA in vier getrennten Ansätzen jeweils vollständig mit den drei Restriktionsenzymen Alu I, HaeIII und Eco RI*, sowie in einem Fall mit HaeIII und zugleich Alu I hydrolysiert. Sodann wurde jedes diese Fragmentgemische mit Eco RI linearisiertem durch DNA Polymerase I Klenow-Fragment aufgefülltem Vektor pPV33 (vergl. Fig. 1) über Nacht bei 15°C mit Phagen T4-Ligase inkubiert. Am nächsten Tag wurde der kompetente E. coli Stamm DH1 mit einem Aliquot der Ligasemischung transformiert und resistente Klone auf Agarplatten, die 50 µg/ml Ampicillin sowie 10 µg/ml Tetracyclin enthielten, selektioniert. Wie in Tab. 4 zu sehen ist, ist die Ausbeute ampicillin- und tetracyclin-resistenter Kolonien bezogen auf ein Vergleichsexperiment mit E. coli DNA äußerst gering.

Restriktionsenzym	Transformanten pro μg DNA	
	Ap ^r Tet ^s	Ap ^r Tet ^r
Alu I	$3,6 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^1$
HaeIII	$9,9 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^1$
Alu I /HaeIII	$3,6 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^1$
Eco R I *	$6,4 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$
Kontrolle pPV33: (unbehandelt)	$2,1 \cdot 10^6$	0

**Tab. 4 Bestimmung der Transformationsfrequenzen "shotgun"-
klonierter, fragmentierter M. luteus DNA**

Bei einem Vergleichsexperiment mit E. coli DNA erhielten Neve et al. (1979) 29,3% promotoraktive Rekombinante (Ap^rTet^r). Dabei wurde die Anzahl aller Rekombinanten als 100% gesetzt.

Wie läßt sich dieser Befund erklären? Eine ineffiziente Ligasereaktion kann ausgeschlossen werden, da ampicillinresistente Transformanten, die durch Ligierung der stumpfen Vektorenden entstehen, erhalten werden. Zudem wurden die T4-Ligase, der präparierte Vektor pPV33, als auch die Salzmischung für die Ligasereaktion bei einem anderen Experiment(siehe S.30) mit Erfolg verwendet. Da der unbehandelte Vektor ebenfalls eine hohe Ausbeute an Transformanten ergibt, scheidet eine zu geringe Transformationsrate des E. coli Stammes DH1 aus. Man könnte weiter einwenden, daß die molaren Verhältnisse zwischen Vektor- und Insert-DNA nicht den optimalen Verhältnissen entsprächen (Dugaiczky et al., 1975) und daß auf diese Weise die Ligierung des Vektors mit sich selbst favorisiert wird. Dem möchte ich entgegen, daß Veränderungen der DNA-Konzentration zwischen Vektor- und Insert-DNA in Parallelversuchen die Ausbeute an Rekombinanten nicht signifikant erhöhten. Da zur Selektion der rekombinanten Klone eine geringe Tetracyclin-Konzentration von

10µg/ml eingesetzt wurde, scheidet der Einwand, nur auf starke und damit wenige Promotoren zu selektionieren, aus. Dadurch, daß zur Hydrolyse der zellulären M. luteus DNA insgesamt drei Restriktionsenzyme verschiedener Erkennungssequenz eingesetzt wurden, sollte auch das Problem der Promotorinaktivierung durch Restriktionsverdauung sekundär sein.

Viel wahrscheinlicher ist es, daß die E. coli RNA Polymerase nur in sehr begrenztem Maße Promotoren auf der dG + dC-reichen M. luteus DNA in vivo erkennt; - was die geringe Ausbeute an Rekombinanten erklären würde. Diese Erklärung wird dadurch untermauert, daß in E. coli klonierte Streptomyces- und Caulobactergene von der E. coli RNA Polymerase ebenfalls in vivo nicht transkribiert werden (Thompson und Gray, 1983; Chater, 1982; Milhausen et al., 1982; Ohta et al., 1982). Streptomyces DNA enthält zwischen 72-74% dCdG (Thompson und Gray, 1983) und Caulobacter ϕ Cd1 DNA 67% dCdG (Amemiya und Shapiro, 1983). Bei einem "Shotgun"-Experiment mit hydrolysiertem Rhizobium japonicum DNA (64% dCdG) in ein Promotor-Selektionsplasmid fanden Neve et al. (1979) ebenfalls nur wenige promotoraktive Rekombinaten in E. coli.

Analyse der Klone

Bei der Betrachtung der Klone nach der Transformation fiel auf, daß deren Koloniegrößen sehr variierten. So waren beispielsweise manche Kolonien nur halb so groß wie andere, was möglicherweise auf verschiedene Transkriptionshäufigkeit der Tetracyclin-mRNA und damit auf unterschiedliche Promotoraktivität der insertierten M. luteus DNA in vivo schließen läßt. Für die weiteren Untersuchungen wurden ausschließlich die großen Kolonien verwendet. Plasmide, die aus der Klonierung mit Alu I hydrolysiertem M. luteus DNA hervorgingen, erhielten die Bezeichnung pMA vor der Klonnummer, wobei p für Plasmid, M für Micrococcus und A für Alu I steht. Analog wurden die

durch HaeIII-, Eco RI^{*},- und HaeIII/Alu I-Verdauung entstandenen rekombinanten Plasmide als pMH, pME und pMHA bezeichnet. Durch Schnellaufschluß wurde sodann die rekombinante Plasmid-DNA einer gewissen Anzahl von Klonen isoliert, mit Eco RI hydrolysiert und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Von 14 untersuchten pMA-Plasmiden enthielten alle ein oder zwei Eco RI-Insertfragmente. Von 17 pMH-Plasmiden konnte bei elf Insert-DNA beobachtet werden, die restlichen sechs Plasmide waren nicht mit Eco RI zu hydrolysieren, was gelegentlich bei Schnellaufschlüssen beobachtet wird, wenn das Nährmedium nicht quantitativ von der DNA abgetrennt wurde. Aus dem gleichen Grund wurde von zehn untersuchten pME-Plasmiden nur bei einem, pME14 ein Insertfragment beobachtet, das in Fig. 26 abgebildet ist. Von den drei analysierten pMHA-Plasmiden enthielten alle ein bzw. zwei Insert-Fragmente (Fig. 26).

Von den analysierten rekombinanten Plasmiden wurden nur diese weiter verwendet, deren Insert-Länge weniger als etwa 900 Bp betrug. In Fig. 26 ist das Ergebnis der Restriktionsanalyse von zehn Plasmiden zu sehen, die (außer pME14) die oben genannten Bedingungen erfüllen. Die Fragmentlängen sind in Tab. 5 zusammengefaßt. Es fällt auf, daß die Plasmide pMHA1 und pMHA10, sowie pMA2 und pMA5 nach Eco RI-Hydrolyse ein identisches Fragmentmuster zeigen; was wiederum ein Hinweis darauf ist, daß in *M. luteus* DNA nur wenige DNA-Fragmente, die einen *E. coli* Promotor enthalten, existieren, vorausgesetzt diese Klone stellen unabhängige Transformationsereignisse dar. Bei der Betrachtung der klonierten DNA in Fig. 26 fällt das Plasmid pMH⁴ besonders auf, da es nur ein (und dazu besonders kleines) Insert besitzt.

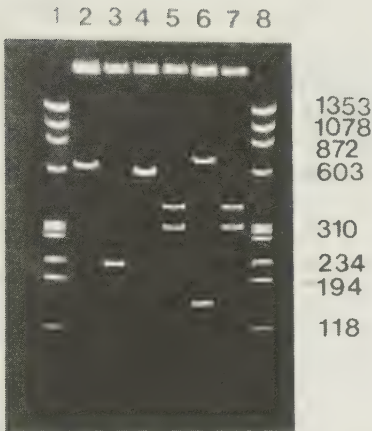
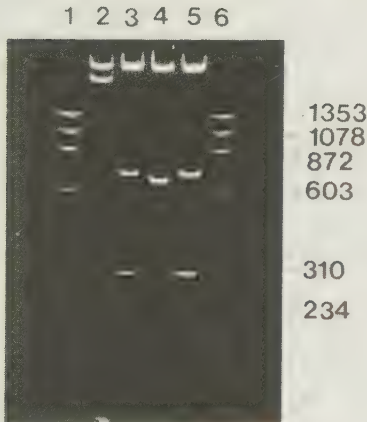


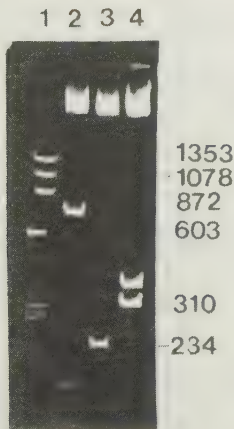
Fig. 26

Gelanalyse promotorhaltiger rekombinanter Plasmide durch Hydrolyse mit Eco R I

- Spur 1: ϕ x174/HaeIII
- Spur 2: pMHA6/Eco R I
- Spur 3: pMH4/Eco R I
- Spur 4: pMA7/Eco R I
- Spur 5: pMA5/Eco R I
- Spur 6: pMA3/Eco R I
- Spur 7: pMA2/Eco R I
- Spur 8: ϕ x174/HaeIII



- Spur 1: ϕ x174/HaeIII
- Spur 2: pME14/Eco R I
- Spur 3: pMHA1/Eco R I
- Spur 4: pMHA6/Eco R I
- Spur 5: pMHA10/Eco R I
- Spur 6: ϕ x174/HaeIII



- Spur 1: ϕ x174/HaeIII
- Spur 2: pMH3/Eco R I
- Spur 3: pMH4/Eco R I
- Spur 4: pMH5/Eco R I

Die Plasmid-DNAs wurden teilweise durch CsCl-Gradientenzentrifugation gewonnen, Eco R I hydrolysiert und anschließend in einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Plasmid	Eco R I -Insert- Fragmentlängen (Bp)	Summe (Bp)
pMA2	310, 380 ¹⁾	690
pMA3	160, 710 ¹⁾	870
pMA5	310, 380	690
pMA7	590, 600	1190
pME14	2500 $\pm$ 50	2500 $\pm$ 50
pMH3	160, 710	870
pMH4	230 ²⁾	230
pMH5	320, 390	710
pMHA1	280, 690	970
pMHA6	630	630
pMHA10	280, 690	970

Tab. 5 Ermittlung der Insertfragmentlängen rekombinanter Plasmid-DNAs durch Hydrolyse mit Eco R I

Durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigte Plasmid-DNA wurde durch Eco R I hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (vergl. Fig. 26). Als Längenstandard wurde ϕ X174/HaeIII DNA verwendet (Fehlergrenze, wenn nicht anders angegeben $\pm$ 20 Bp).

- 1) E. coli Promotor auch in vitro nachgewiesen
- 2) Durch Sequenzbestimmung auf 219 Bp bestimmt

In vivo Promotoraktivität des Klons mit dem kleinsten Insert

Zur Bestimmung des EOP₅₀-Werts (Efficiency of plating vergl. S. 35) wurden Plasmid pMH4-haltige E. coli Zellen bis zur logarithmischen Phase geschüttelt, mit L-Broth-Medium verdünnt und auf frisch gegossene ampicillinhaltige Agarplatten verschiedener Tetracyclinkonzentration ausgesät. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Anzahl der Kolonien pro Petrischale bestimmt. Bei einer Tetracyclinkonzentration von 35 µg/ml in Agar konnte kein Kolonienwachstum mehr beobachtet werden. Der EOP₅₀-Wert für den E. coli Promotor in Plasmid pMH4 betrug deshalb 30-35 µg/ml Tetracyclin (Tab. 6). Der Vektor pPV33 ist bereits gegen 1 µg/ml Tetracyclin (vergl. Tab. 1) empfindlich. Es ist interessant, daß sich die Koloniengröße bis 25 µg/ml Tetracyclin in Agar nicht veränderte. Bei einer Erhöhung des Antibiotikums um fünf Mikrogramm pro Milliliter halbierte sich das Wachstum der Bakterien jedoch.

Dieses Ergebnis zeigt klar, daß die in dem Plasmid (pPV33) als Insertion enthaltene Micrococcus-DNA eine in E. coli phänotypisch meßbare Promotoraktivität zeigt. Dabei entspricht diese ungefähr 50% des Wildtyp-Tetracyclinpromotors (EOP₅₀ = 65 µg/ml Tetracyclin).

Tetracyclin [µg/ml]	Anzahl der Kolonien		gemittelt
	Petrischale 1	Petrischale 2	
15	148	154	151
20	139	142	141
25	135	133	134
30	126	128	127
35	0	(1)	0

Tab. 6 Ermittlung der in vivo Tetracyclin-Resistenzkonzentration des Klons mit dem kleinsten Insert (pMH4)
Erklärung im Text.

Selektion auf in vitro Transkripte mit E. coli Enzym

Die durch in vivo Untersuchungen festgestellte Promotoraktivität der E. coli RNA Polymerase an klonierter M. luteus DNA sollte sich auch in der in vitro Transkription durch die Entstehung definierter Transkripte nachweisen lassen. Dazu wurde die Plasmid-DNA pMA2 und pMA3, durch Gradientenzentrifugation isoliert, mit Eco R I hydrolysiert, die einzelnen Fragmente nach einer abgewandelten Vorschrift von Maxam und Gilbert (1977) aus einem Polyacrylamidgel isoliert und auf in vitro Transkripte mit E. coli Enzym selektioniert.

Bei der Transkription des 160 Bp Eco R I -Fragments des Plasmids pMA3 (vergl. Tab. 5) durch die RNA Polymerase aus E. coli entstehen drei sehr intensive Transkripte A, B, C (Fig. 27). Wiederholt man dieses Experiment unter identischen Bedingungen mit M. luteus Enzym, so sind diese drei RNAs nicht mehr nachzuweisen (Fig. 27). Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Transkription des 310 Bp Eco R I -Fragments des Plasmids pMA2 gemacht (Fig. 28). An diesem Fragment synthetisiert die E. coli RNA Polymerase - neben hochmolekularen Produkten auf der Gelauftragsstelle - zwei diskrete etwa 190 200 N lange RNAs. Untersucht man die RNA-Synthese der M. luteus Polymerase unter identischen Bedingungen an dieser Matrize, so beobachtet man wiederum keine RNA-Synthese (Fig. 28).

Demzufolge unterscheiden sich beide Enzymspezies in der Selektivität und Aktivität der Transkription auch wieder an diesen beiden Restriktionsfragmenten. Dies sind zwei Beispiele dafür, daß an klonierten M. luteus DNA nur die E. coli Polymerase Transkripte initiiert. Eine ähnliche Beobachtung haben Amemiya und Shapiro (1983) bei der Transkription der Caulobacter ϕ Cd I -Phagen DNA gemacht. An dieser Matrize synthetisiert das E. coli Enzym spezifische Transkripte, welche von der Caulobacter crescentus RNA Polymerase nicht katalysiert werden. Es existieren folglich ebenso Sequenzen in M. luteus DNA, die fast ausschließlich von dem E. coli Enzym verwendet werden.



Fig. 27

**In vitro Transkription an dem 160 Bp
Eco R I -Fragment des Plasmids pMA3
durch M. luteus und E. coli Enzym**

**Spur 1: RNA-Synthese mit E. coli
Polymerase**

**Spur 2: RNA-Synthese mit M. luteus
Enzym**

A, B, C: E. coli Transkripte

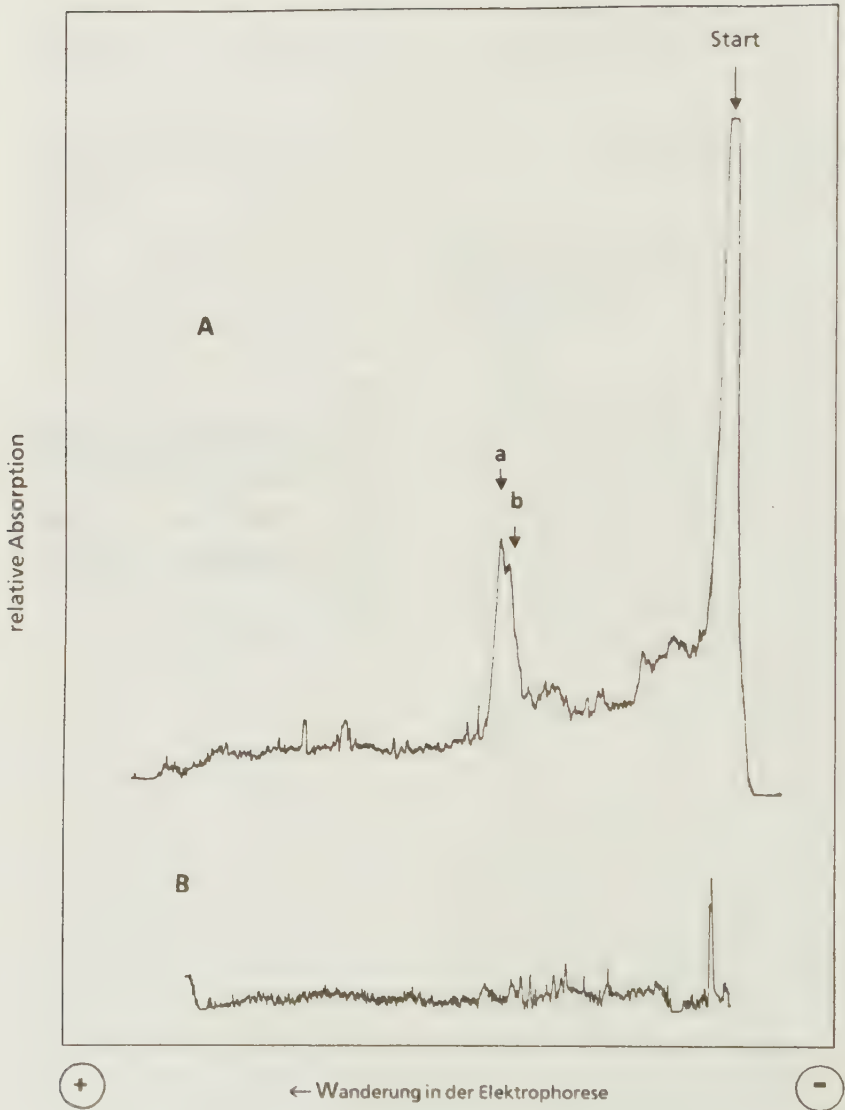


Fig. 28 In vitro Transkription an dem 310 Bp Eco R I -Fragment aus Plasmid pMA2 durch M. luteus und E. coli Polymerase

- A: RNA-Synthese mit E. coli Enzym
B: RNA-Synthese mit M. luteus Enzym

Die Auftrennung der Transkripte erfolgte in einem 8%igen denaturierenden Polyacrylamidgel. Nach Autoradiographie wurde der Röntgenfilm densitometrisch ausgewertet. a, b: E. coli Transkripte

M. luteus Promotoren auf klonierter M. luteus DNA

Auf M. luteus DNA existieren DNA-Sequenzen, an denen die E. coli RNA Polymerase im Vergleich zur M. luteus Polymerase eine ausgesprochene Spezifität zeigt (vergl. vorherigen Abschnitt). Wäre dies auch umgekehrt der Fall, so würde sich dadurch die Möglichkeit ergeben, erstmals einen natürlichen M. luteus Promotor zu isolieren und zu identifizieren.

Selektion auf in vitro Transkripte mit M. luteus Enzym

Die Transkription des 380 Bp langen Eco R I-Fragments aus Plasmid pMA2 durch die RNA Polymerase aus M. luteus liefert neben radioaktiven Produkten heterogener Länge zwei diskrete RNAs mit einer Länge von ca. 200 und 210 Nukleotiden, wenn zur Berechnung der Transkriptlängen HaeIII hydrolysierte, denaturierte ϕ x174 DNA verwendet wird (Fig. 29). Transkribiert man dieses Fragment in identischer Weise mit E. coli Enzym, so beobachtet man die beiden M. luteus Transkripte in der Autoradiographie nicht (Fig. 29). Stattdessen synthetisiert die E. coli Polymerase mehrere andere Transkripte unterschiedlicher Mobilität und Intensität. Aus dem Fehlen eines gemeinsamen identischen Musters an niedermolekularen Stotterprodukten folgere ich, daß es sich bei den beiden M. luteus Transkripten um promotorspezifische RNAs handelt (Lee et al., 1980), welche von der E. coli RNA Polymerase unter diesen Bedingungen nicht synthetisiert werden können. Daß es sich bei den spezifischen M. luteus RNAs nicht um das Produkt unterschiedlicher Termination von M. luteus und E. coli Polymerase handelt, spricht der Befund von Brack et al. (1984), wonach die M. luteus und E. coli Polymerase identisch, wie auch andere eubakterielle RNA Polymerasen (Wiggs et al., 1979) terminieren. Wäre dies nicht der Fall, so müßte man auf dieser relativ kurzen Matrize die Existenz eines bis jetzt unbekannten spezifischen Terminators für eines der betrachteten Enzyme fordern.

Die beiden Enzyme unterscheiden sich folglich unter Voraussetzung identischer Termination der RNA-Synthese in der Selektivität der Transkriptionsinitiation. Der Einwand, daß dieses Resultat auf den unterschiedlichen Gehalt an aktiven Enzymmolekülen in den Präparationen zurückzuführen ist (Chamberlin *et al.*, 1979), kann deshalb kaum ins Gewicht fallen, da mit einem hohen Enzymproteinüberschuß gearbeitet wurde. Außerdem wurde man erwarten, daß falls dies der Fall wäre, beide Polymerasen ein identisches Transkriptmuster, jedoch mit unterschiedlicher Gesamtintensität erzeugen.

Im vorangegangenen Abschnitt dieser Arbeit wurde bei dem Plasmid pMA2 dasselbe Restriktionsmuster wie bei Plasmid pMA5 entdeckt (vergl. Fig. 26). Sollten beide Plasmide identische Insertionen enthalten, so sollte sich auch in der *in vitro* Transkription ein identisches RNA-Muster ergeben. Tatsächlich entsteht bei der RNA-Synthese an dem 380 Bp großen Eco RI-Fragment von Plasmid pMA5 ein RNA-Muster, das mit dem zuvor beschriebenen an der pMA2 Matrize nahezu identisch ist (Fig. 29). Dieser Befund unterstützt die im vorigen Kapitel geäußerte Vermutung, wonach in *M. luteus* DNA nur wenige, *in vivo* von *E. coli* Polymerase benützte Promotoren vorkommen.

In vitro Promotoraktivität des Klons mit dem kleinsten Insert

Bei der Transkription des gelelektrophoretisch gereinigten 230 Bp langen Eco RI-Fragments des Plasmids pMH4 (H4 DNA) durch die RNA Polymerase aus *M. luteus* entsteht als einziges Produkt ein intensives ca. 70 - 75 Nukleotide langes Transkript, das im weiteren als H4 RNA bezeichnet wird (Fig. 30). Transkribiert man dieses Restriktionsfragment unter identischen Bedingungen mit *E. coli* Enzym, so beobachtet man an der Stelle im Gel, an der die H4 RNA wandert, nur relativ wenig diffus verteilte Radioaktivität (Fig. 30). Stattdessen entsteht ein etwas kürzeres, schwach markiertes Transkript neben einer Reihe anderer höhermolekularer intensiver RNAs.

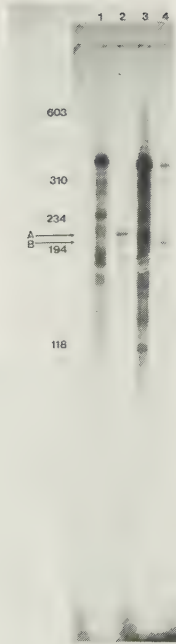


Fig. 29

Vergleichende Transkription an dem 380 Bp Eco R I - Fragment aus Plasmid pMA2 und pMA5 durch M. luteus und E. coli Polymerase

Spur 1: RNA-Synthese mit E. coli Polymerase an pMA2-Fragment

Spur 2: RNA-Synthese mit M. luteus Polymerase an pMA2-Fragment

Spur 3: RNA-Synthese mit E. coli Polymerase an pMA5-Fragment

Spur 4: RNA-Synthese mit M. luteus Polymerase an pMA5-Fragment

A, B: spezifische M. luteus Transkripte mit einer Länge von ca. 210 und 200 Nukleotiden.



Fig. 30

In vitro RNA-Synthese an dem 230 Bp Eco R I -Fragment aus Plasmid pMH4 (H4 DNA) durch M. luteus und E. coli RNA Polymerase

Spur 1: Transkription mit E. coli Enzym
(oberste Bande: Auftragstelle
zweite Bande: geschätzte Länge der RNA etwa 230 N
dritte Bande: geschätzte Länge der RNA etwa 160 N)

Spur 2: Transkription mit M. luteus Enzym

A: spezifisches M. luteus Transkript (H4 RNA)

Mit Hilfe dieses spezifischen Micrococcus luteus Transkriptes sollte es möglich sein, einen nativen M. luteus Promotor zu identifizieren. Außerdem sollte an diesem Beispiel gezeigt werden, daß die M. luteus Polymerase spezifisch innerhalb der Matrize und nicht an Fragmentenden initiiert.

Salzabhängigkeit

Bei allen bisherigen Untersuchungen wurde eine relativ hohe Salzkonzentration von 0,2 M KCl verwendet. Diese Konzentration wurde bei der *in vitro* Transkription des M. luteus Enzyms an E. coli DNA verwendet (Ernst, 1981, Brack, 1983). Hier soll nun untersucht werden, ob diese Ionenstärke ebenfalls zu einer starken RNA Synthese an M. luteus DNA führt, oder ob die spezifische Transkription bei hohen Salzkonzentrationen gehemmt wird (Amemiya und Shapiro, 1982, Chapman und Weiss, 1982). Dazu wurde die H4 DNA isoliert und mit verschiedenen KCl Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,2 M KCl mit M. luteus Polymerase transkribiert (Fig. 31). Man beobachtet, daß bei allen untersuchten KCl Konzentrationen das M. luteus Enzym die H4 RNA synthetisiert. Bei einer Salzkonzentration von 0,2 M KCl scheint die H4 RNA Synthese am intensivsten.

Damit zeigt die M. luteus Polymerase eine ausgeprägte Präferenz für hohe Ionenstärken im *in vitro* Transkriptionssystem an nativer DNA. Bei *in vitro* Transkriptionsuntersuchungen von S. subtilis Phagen DNA mit S. subtilis RNA Polymerase wurde ebenso eine wesentlich höhere Syntheserate bei erhöhter Salzkonzentration im Transkriptionsansatz gefunden. Die Ionenstärke von 0,2 M KCl wurde auch als das RNA-Synthese Maximum bei der Transkription des *lac* Promotors von E. coli RNA Polymerase durch Mulligan *et al.* (1985) ermittelt.

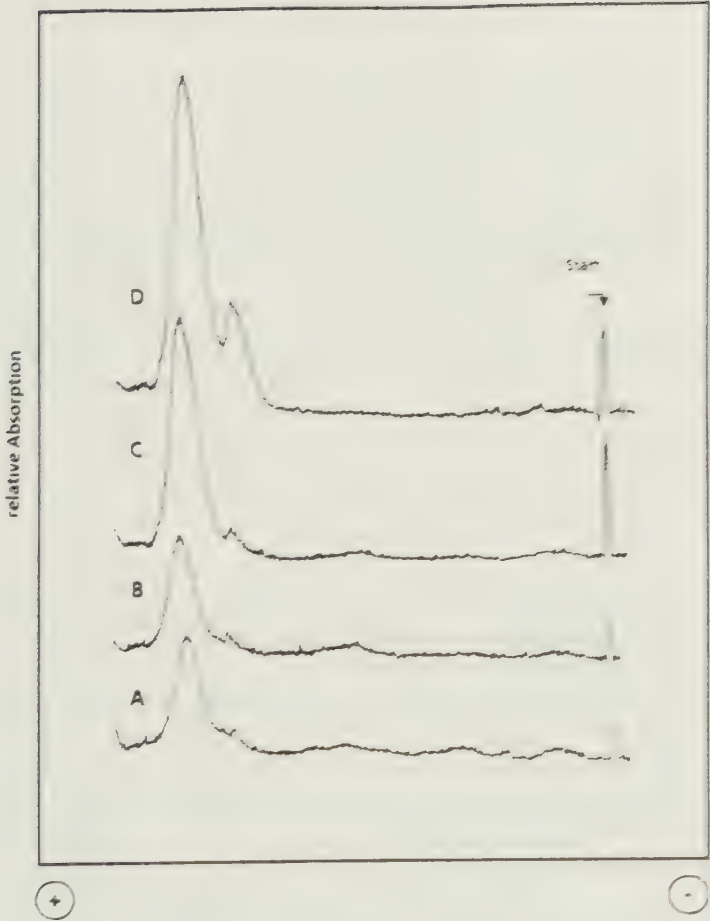


Fig. 31 Abhängigkeit der H4 RNA-Synthese von der im Transkriptionsansatz herrschenden Ionenstärke

- A: Transkription in Gegenwart von 50 mM KCl
- B: Transkription in Gegenwart von 100 mM KCl
- C: Transkription in Gegenwart von 150 mM KCl
- D: Transkription in Gegenwart von 200 mM KCl

Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem denaturierenden 4%igen Polyacrylamidgel. Der Start der densitometrischen Auswertung der Autoradiographie begann 20 cm nach der Gelauftragsstelle. Durch Erhöhung der Ionenstärke im Transkriptionsansatz steigt die H4 RNA-Syntheserate um den Faktor drei bis vier (vergl. A und D).

Sequenzierung des Fragments

Ein Ziel dieser Arbeit war es, erstmals die Sequenz eines nativen M. luteus Promotors zu ermitteln. Dazu ist die Kenntnis der DNA-Sequenz eine Voraussetzung. Von den beiden in der Literatur beschriebenen Sequenzierungsverfahren, nämlich die Sequenzierung durch basenspezifische chemische Spaltung (Maxam und Gilbert, 1977) und der enzymatischen DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977), wählte ich letztere Methode, da diese unabhängig von Restriktionsschnittstellen durchzuführen ist und außerdem zeitintensive Markierungs- und Reinigungsschritte entfallen.

Zu diesem Zweck war es zuerst notwendig, die in dem Plasmid pMH4 vorliegende Insert-DNA in ein für dieses Sequenzierungsverfahren geeigneten Vektor wie M13 mp11 RF DNA (Norlander et al., 1983) umzuklonieren. Dazu wurde das 230 Bp lange Eco RI Fragment durch Gelelektrophorese isoliert und über Nacht bei 14°C in Gegenwart von T4-Ligase mit Eco RI linearisierten und mit alkalischer Phosphatase behandeltem Vektor M13 mp 11 RF DNA ligiert. Nach Transformation kompetenter JM 103 E.coli Bakterienzellen durch ein Aliquot des Ligerungsansatzes wurden von zehn nach der Transformation erhaltenen weißen Plaques die RF-DNA durch Schnellaufschluß isoliert und mit Eco RI hydrolysiert. In neun Fällen konnte die H4 DNA durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden (ohne Beleg). Sodann wurden rekombinante M13-Phagen in den Wirtszellen vermehrt und durch Zugabe von Polyethylenglykol gefällt. Einzelsträngige Phagen DNA und Primer DNA wurden in Gegenwart einer Salzmischung für ca. fünf Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung der mit dem Primer hybridisierten DNA auf Raumtemperatur wurde das Gemisch durch Zugabe von ³²S-markiertem dATP, DNA Polymerase Klenow-Fragment und DTE vervollständigt und anschließend auf vier Reaktionsgefäße verteilt, die die vier Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate, sowie von

einem dessen Didesoxyanalog enthielten. Nach Synthese des komplementären Stranges durch das Klenow-Fragment wurden die vier Proben denaturiert und in einem harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Auswertung der Radiographie (Fig. 32) mit Hilfe eines Computerprogrammes (Beckman: Microgenie) ergab nach Sequenzierung beider Stränge für die H4 DNA eine Länge von 219 Bp.

Die sequenzierte M. luteus DNA hat einen Anteil von 70% dCdG und stimmt damit mit dem von Schildkraut et al. (1962) ermittelten Wert für M. luteus DNA von 72% dCdG recht gut überein.

Die DNA-Sequenz lautet:

EcoR I

10	20	30	40	50	60
GAATTCGGGG	GCGACGTTCA	CCATCGACCT	GCCCACCAAG	CAGCCCCCGG	ACCAGCCCAC
CTTAAGGCC	CGCTGCAAGT	GGTAGCTGGA	CGGGTGGTTC	GTCGGGGGGC	TGGTCGGGTG
70	80	90	100	110	120
CTACCGGGCG	ACCGGTTTAT	CCACCGTGAA	CACCGGCGCT	CCACCCCTTG	AATGATACCC
GATGGCCGCG	TGGGCAAATA	GGTGGCACTT	GTGGCCGCGA	GGTGGGGAAC	TTACTATGGG
130	140	150	160	170	180
CCGGGGGGTA	TATACTAAGA	GGAGAAGCGC	CGTCCGGCGC	CGCCCTCAGA	CCTGAAGGAG
GGCCCCCAT	ATATGATTCT	CCTCTTCGCG	GCAGGCCGCG	GCGGGAGTCT	GGACTTCCTC
190	200	210	220	EcoR I	
ACCGTCATGA	CCGAATCCGC	CCGCACCCCG	CTGCCGGGGG	AATTC	
TGGCAGTACT	GGCTTAGGCG	GGCGTGGGGC	GACGGCCCCC	TTAAG	

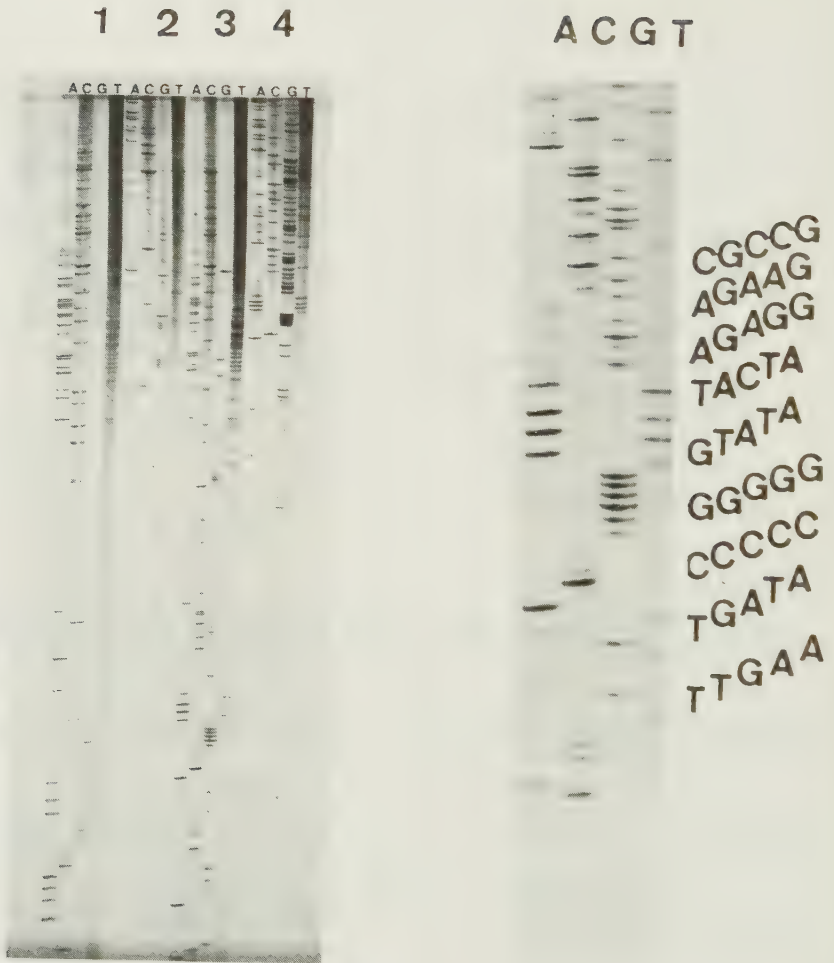


Fig. 32 Sequenzierung der H4 DNA

links: Vollständige Sequenz der H4 DNA

1,2: unterer DNA-Strang nach versetzter Auftragung

3,4: oberer DNA Strang nach versetzter Auftragung

rechts: Ausschnitt aus der Gesamtsequenz (Position 108-152)

Die Proben wurden in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Lokalisation des Promotors

- durch Transkriptlängen

Um den Bereich der Startstelle der H4 RNA einzugrenzen, transkribierte ich die durch Restriktionsenzym-Hydrolyse verkürzte H4 DNA mit der RNA Polymerase aus M. luteus (Fig. 33, 34). Zu diesem Zweck wurde das gelelektrophoretisch isolierte Eco RI-Fragment des Plasmids pMH4 mit den Restriktionsenzymen Taq I, Sma I, Fnu 4 H I und Hinf I hydrolysiert. Die Vollständigkeit der Enzymreaktion wurde anschließend durch Gelelektrophorese überprüft. Bei der in vitro Transkription des Taq I hydrolysierten Fragments entsteht ein Transkript, das dieselbe elektrophoretische Mobilität im Gel zeigt wie die H4 RNA (Fig. 34). Transkribiert man die mit Hinf I behandelte H4 DNA in analoger Weise, so beobachtet man eine um etwa 17 Nukleotide verkürzte H4 RNA in der Autoradiographie (Fig. 34). Zur Ermittlung der RNA-Längen wurden denaturierte DNA-Fragmente verwendet (Wu et al., 1983; Hillen et al., 1983). Demzufolge wurde für die H4 RNA eine Länge von ca. 73 Nukleotiden - und für das Transkript des Fragments Eco RI/Hinf I eine Länge von etwa 56 Nukleotiden ermittelt (Fig. 35). Dieses gebräuchliche Verfahren erlaubt jedoch keine exakte Bestimmung der RNA-Längen, da RNA-Moleküle eine geringere elektrophoretische Mobilität in der Gelelektrophorese besitzen als einzelsträngige DNA-Moleküle (Krause et al., 1983). So besitzt beispielsweise eine 85 Nukleotide lange RNA (H_E-RNA; Ernst et al., 1982) mit dieser Längenbestimmungsmethode eine Länge von etwa 83 Nukleotiden (Abb. 35).

Aus der Länge des verkürzten Transkripts wird ersichtlich, daß die Startstelle des H4 Transkripts nur innerhalb des größeren der beiden Eco RI/Hinf I Fragmente liegen kann. Da nur die Verkürzung der H4 DNA durch Hinf I (und nicht durch Taq I um etwa 20 Basenpaare) ein entsprechend verkürztes Transkript bewirkte, folgere ich, daß die Startstelle der H4 RNA ca. 73

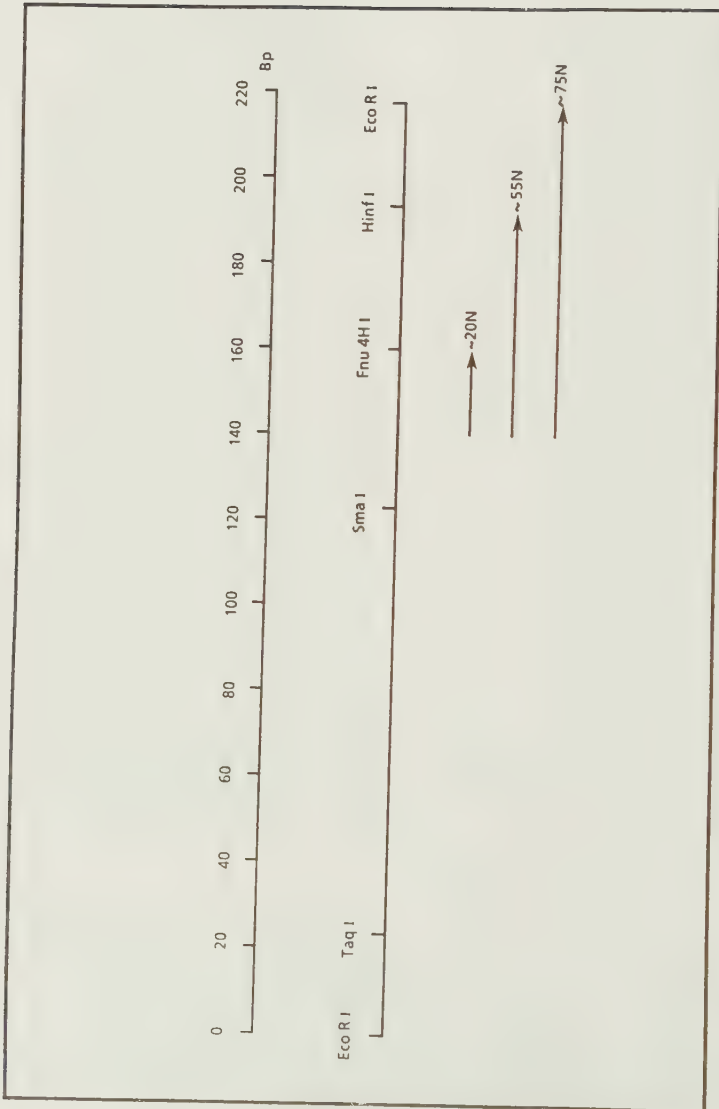


Fig. 33. Restriktionskarte der H4 DNA

Die Restriktionsschnittstellen, die zur Erzeugung von Matrizen für die Abbruchtranskription dienen, sind mit Hilfe eines Computerprogrammes aus der DNA Sequenz entnommen worden. Unterhalb der Restriktionskarte sind die Längen der zu erwarteten Transkripte angegeben. Taq I: Position 24; SmaI: Position 120; Fnu4HI: Position 159; HinfI: Position 193.

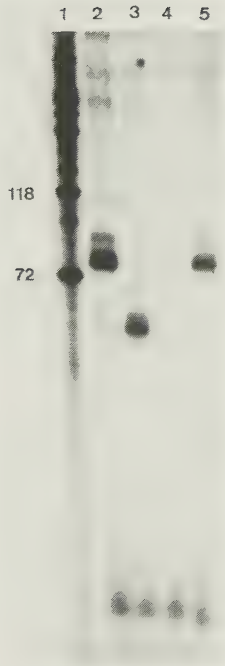


Fig. 34 Transkription an die durch Restriktionsverdauung verkürzte H4 DNA durch M. luteus Polymerase

- Spur 1: DNA-Längenstandard (ϕ x174 RF DNA /HaeIII)
- Spur 2: Transkription an H4 DNA
- Spur 3: Transkription an H4 DNA/Hinf I
- Spur 4: Transkription an H4 DNA/Sma I
- Spur 5: Transkription an H4 DNA/Taq I

Die RNAs wurden in einem denaturierenden 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

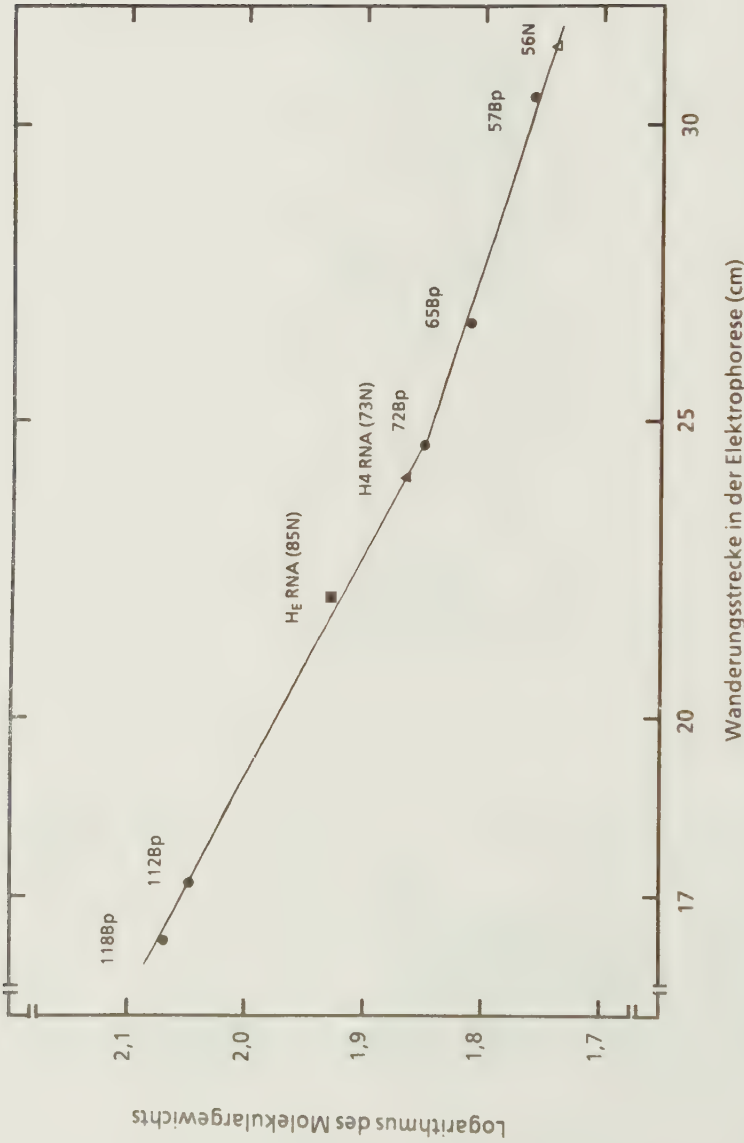


Fig. 35. Längenbestimmung unterschiedlich langer *M. luteus* Transkripte von H4 DNA

Zur Längenbestimmung der RNAs in der Gelelektrophorese wurde eine lineare Beziehung zwischen der Wanderungsstrecke denaturierter DNAs und dem Logarithmus der Anzahl der Basenpaare dieser DNAs zugrunde gelegt. Als DNA-Längenstandard wurde ϕ x174/HaeIII-DNA, sowie mit Mnl I hydrolysiertes ϕ x174/HaeIII/7-Fragment verwendet. Zusätzlich ist die Position der 85 Nukleotide langen H_E-RNA (Ernst et al., 1982) eingezeichnet. -●- denaturierte DNA-Fragmente, ->- H₄-RNA; -Δ- Transkript des H4/Hinf I Fragments, -■- H_E-RNA; Transkript des HaeIII/7 Fragments aus ϕ x174 RF DNA.

Basenpaare stromaufwärts von der rechten Eco RI-Stelle und etwa 56 Basenpaare entfernt von der Hinf I Schnittstelle liegen sollte. Damit wird ersichtlich, daß die H4 RNA innerhalb des Fragments initiiert und am rechten Eco RI -Ende terminiert.

Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde die durch Fnu 4H I fragmentierte H4 DNA in Gegenwart von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -CTP mit M. luteus Enzym transkribiert und in einem hochprozentigen Sequenzgel analysiert (Fig. 36). Als Längenstandard wurde eine radioaktiv markierte RNA-Leiter verwendet. Wie man sieht, entsteht eine RNA, deren elektrophoretische Mobilität etwa einer 10 - 20 Nukleotide langen RNA entspricht. Eine genauere Größenbestimmung läßt dieses Verfahren nicht zu, da nicht bekannt ist, welches radioaktive Produkt in der RNA-Leiter dem Dinukleotid zuzuordnen ist. Dies bedeutet, daß der Startbereich des Transkripts in einem Bereich um Position 140-150 in der H4 DNA liegen sollte. Da die für die Transkriptionsinitiation wichtige Signalsequenz bei Prokaryoten wie E.coli und B.subtilis in einem Bereich bis etwa 45 Bp stromaufwärts von der Initiationsstelle liegen, sollte bei der Transkription Sma I hydrolysierter H4 DNA kein Transkript mehr beobachtet werden. In der Tat wird bei der in vitro RNA-Synthese an dieser Matrice in Analogie zu E.coli und B.subtilis keine RNA mehr beobachtet (Fig. 34).

Dieses Ergebnis bedeutet, daß durch diesen Restriktionsschnitt für die Transkriptionsinitiation mit M. luteus Polymerase wichtige Sequenzen zerstört wurden.

- durch Bestimmung des Startnukleotids

Zur Ermittlung des Startnukleotids des H4-Transkripts wurde das H4-Fragment in Anwesenheit von $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -markierten ATP oder GTP mit M. luteus Polymerase transkribiert und die Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Analyse ergab, daß nur mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ein radioaktiv markiertes Produkt erzeugt wird,

welches dieselbe Mobilität wie die [$\alpha^{32}\text{P}$]UTP markierte H4 RNA im Gel aufweist (Fig. 37).

Dieses Resultat zeigt, daß das spezifische M. luteus Transkript, wie viele mRNAs, ebenfalls mit einem Purin beginnt.

-durch abortive Initiation

Eine weitere Eingrenzung des Promotorbereiches gestattet die abortive Initiation (McClure, 1980), welche die Lokalisation eines Promotors unabhängig von der Transkriptlänge erlaubt. Bei diesem Verfahren werden der RNA Polymerase nur zwei, anstatt vier Nukleotidsubstrate zur Transkription angeboten.

Da die H4 RNA an ihrer Matrize mit einem Adenosintriphosphat beginnt, sollte es möglich sein, das zweite Nukleotid durch abortive Initiation zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde in vier getrennten Ansätzen zu [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP jeweils nur ein Nukleosidtriphosphat in den Transkriptionsansatz zu gegeben. Die entstandenen Produkte wurden anschließend in einem hochprozentigen Gel aufgetrennt (Fig. 38). Bei der Kombination ATP/CTP, ATP/UTP, ATP/ATP entsteht bei der Reaktion mit M. luteus Polymerase kein radioaktives Produkt in der Autoradiographie. Dagegen beobachtet man bei Zugabe von GTP zu [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP radioaktive Produkte unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität im Gel.

Eine Produktanalyse wurde nicht durchgeführt, da dieses Ergebnis zeigt, daß für die Dinukleotidsynthese an H4 DNA als zweites Nukleotidsubstrat GTP notwendig ist.

Dies bedeutet, daß die H4 RNA mit pppApG startet. Durch diese Information sollte es möglich sein, durch Bestimmung eines kurzen Sequenzbereichs am 5'-Ende des Transkripts den Startbereich der H4 RNA innerhalb des fraglichen DNA-Bereichs zu bestimmen.



Fig. 36 Transkription an Fnu 4 H I hydrolysierter H4 DNA durch *M. luteus* RNA Polymerase

Spur 2: RNA-Leiter

Spur 1: Transkription an Fnu 4 H I hydrolysierter H4 DNA

Die RNA-Synthese wurde in Gegenwart von 0,16 mM [α - 32 P] CTP an Stelle von 0,6 mM CTP und mit unmarkierten UTP (0,6 mM) in einem Gesamtvolumen von 62,5 μ l durchgeföhrt. Nach 90minütiger Inkubation bei 37°C wurde ein Aliquot des Transkriptionsgemisches direkt auf ein 25%iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die RNA-Leiter wurde durch Hydrolyse einer 5'-markierten RNA mit NaHCO₃ erzeugt.

A: spezifisches *M. luteus* Transkript

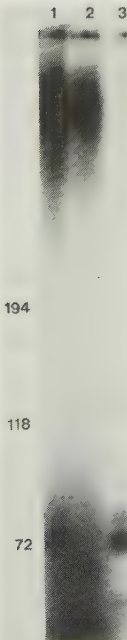


Fig. 37 Ermittlung des Startnukleotids der H4 RNA

Spur 1: Transkription mit [γ - 32 P] ATP

Spur 2: Transkription mit [γ - 32 P] GTP

Spur 3: Transkription mit [α - 32 P] UTP

Die RNAs wurden in einem 4%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

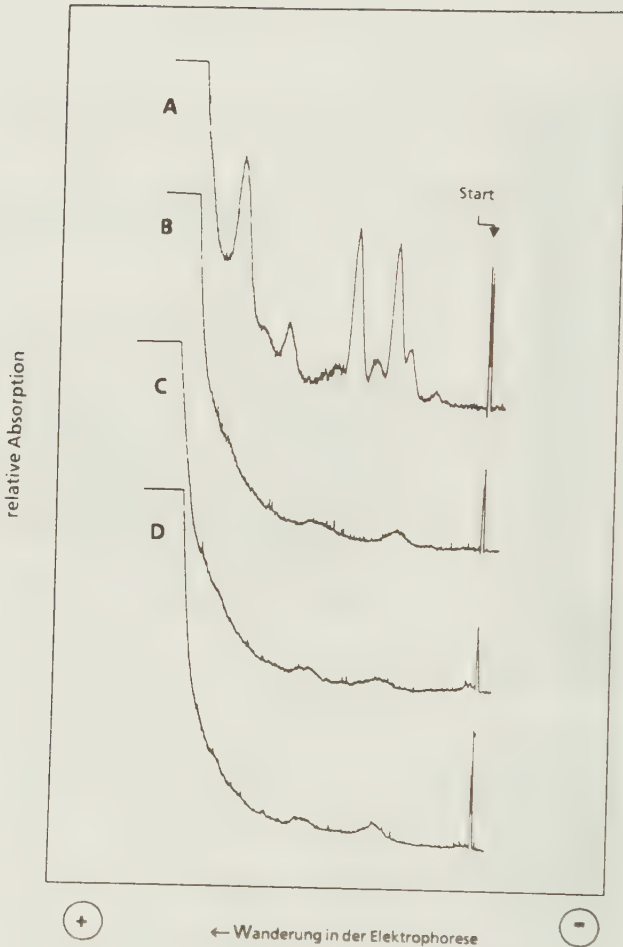


Fig. 38 Abortive Initiation an H4 DNA durch M. luteus Enzym

A: Initiation mit ATP und GTP
C: Initiation mit ATP

B: Initiation mit ATP und CTP
D: Initiation mit ATP und UTP

Die RNA-Synthese an dem Restriktionsfragment (0,1 μ g) durch die M. luteus Polymerase (6,2 μ g) wurde im Testsystem (vergl. Methodenteil) unter folgenden Substratbedingungen durchgeführt: 0,2 mM [α - 32 P]ATP, 0,6 mM GTP (A); 0,2 mM [α - 32 P]ATP, 0,6 mM CTP (B); 0,2 mM [α - 32 P]ATP (C); 0,2 mM [α - 32 P]ATP, 0,6 mM UTP (D). Nach 60 minütiger Inkubation bei 37°C wurde ein Aliquot des Transkriptionsgemisches in einem 25%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Start der densitometrischen Auswertung der Autoradiographie begann 9 cm nach der Gelauftragsstelle.

- durch Sequenzierung des 5'-Terminus der RNA

Bei der Transkription an H4 DNA durch die M. luteus RNA Polymerase in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ beobachtet man in einem 4%igen denaturierenden Polyacrylamidgel zwei Transkripte mit geringfügig unterschiedlicher Mobilität (Fig. 37). Vergleicht man die Intensitäten dieser Produkte miteinander, so findet man, daß die schneller wandernde Bande mehr als dreimal so intensiv ist, wie die andere RNA-Bande. Verwendet man jedoch zur Gelelektrophorese ein 8%iges denaturierendes Polyacrylamidgel, so beobachtet man eine Aufspaltung der beiden Transkripte in einen 25mm langen, diffusen Bereich. Die unterste Zone (Zone C), welche die größte Mobilität besitzt und folglich wohl mit der intensiveren der beiden RNAs (Fig. 37) identisch ist, wurde aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und sequenziert.

Die Sequenzierung wurde zusammen mit Herrn Dr. H. Domdey (Genzentrum der Universität München) nach der "mobility-shift"-Methode (Silberklang et al., 1979) durchgeführt. Dieses Verfahren, welches ursprünglich zur Sequenzierung kurzer DNA-Fragmente entwickelt wurde (Tu und Wu, 1980), läßt sich auch auf Oligoribonukleotide bzw. 5'-terminale Regionen längerer RNAs anwenden (Kikuchi et al., 1982). Hierbei wird die 5'-markierte RNA durch partielle alkalische Hydrolyse oder durch basenunspezifische RNasen kontrolliert abgebaut. Die erhaltenen Oligonukleotide werden anschließend durch Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen (1. Dimension) und durch Chromatographie auf DEAE-Dünnschichtplatten (2. Dimension) in Gegenwart eines RNA-Hydrolysats bestimmter Kettenlänge aufgetrennt. Nach der Autoradiographie läßt sich sodann die Nukleotidsequenz der RNA nach einem von Tu und Wu (1980) beschriebenen Schema ablesen (Fig. 39). Trägt die RNA, wie in diesem Fall an ihrem 5'-Ende, eine Triphosphatgruppe so führt diese hohe negative Ladung zu einem gegenüber dem entsprechenden

2. Dimension

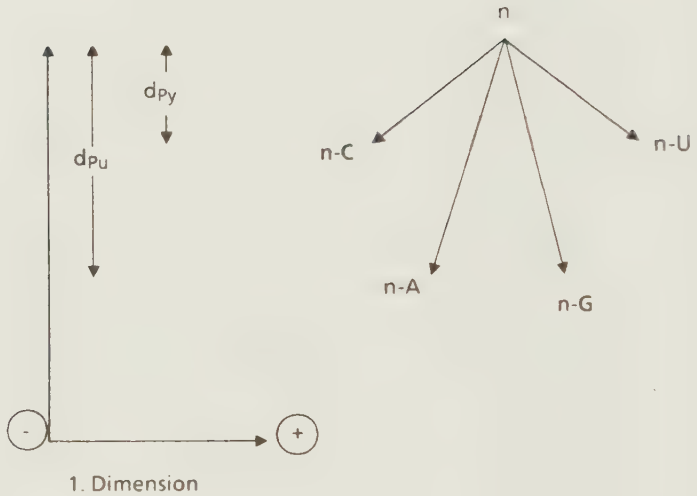


Fig. 39 Diagramm zur Auswertung eines Fingerprints der "mobility-shift"-Analyse (nach Tu und Wu, 1980; entnommen aus Ernst, 1981)

d_{Pu} : Laufstreckendifferenz bei Addition eines Purins

d_{Py} : Laufstreckendifferenz bei Addition eines Pyrimidins

Nukleotid-Monophosphat schnelleren Laufverhalten (Domdey, persönliche Mitteilung).

Demzufolge lautet die RNA-Sequenz der Zone C: pppAGAAG (Fig. 40A).

Diese Sequenz, die auf der DNA-Matrize nur einmal vorkommt, befindet sich genau in dem zuvor durch Messung von Transkriptlängen eingegrenzten DNA-Bereich. Damit ist der Start dieser RNA durch das Adenosin an Position 143 auf der Matrize festgelegt.

131	140	150
5'-TATACTAAGAGGAGAAGCGC-3'		
5'-pppAGAAG..		

Natürlich war auch von Interesse, die RNA-Sequenz des Transkripts mit der geringeren Intensität und Gelmobilität zu bestimmen (Fig. 37). Zu diesem Zweck wurde aus dem diffusen Gelbereich die Zone mit der geringsten Mobilität (Zone A) ausgeschnitten und die RNA-Sequenz im Fingerprint bestimmt (Fig. 40C). Es fällt auf, daß die Heterogenität im vierten Fleck des Fingerprints, welcher auch bei der Sequenzanalyse der Zone C (Fig. 40A) andeutungsweise zu sehen ist, hier wieder auftritt. Die Sequenz dieser RNA lautet: pppAGAGA.

Demzufolge handelt es sich bei dieser RNA um ein anderes zweites Produkt, welches mit dem zuvor sequenziertem (Fig. 40 A) verunreinigt zu sein scheint. Da bekannt ist, daß RNA-Moleküle Sekundärstrukturen ausbilden, scheint der diffuse Gelbereich aus zwei RNA-Spezies zu bestehen, welche mehrere unterschiedliche Konformationen annehmen können und somit in der Gelelektrophorese nicht mehr voneinander getrennt werden können. Der hohe CG-Gehalt der DNA würde ebenfalls für diese Hypothese sprechen.

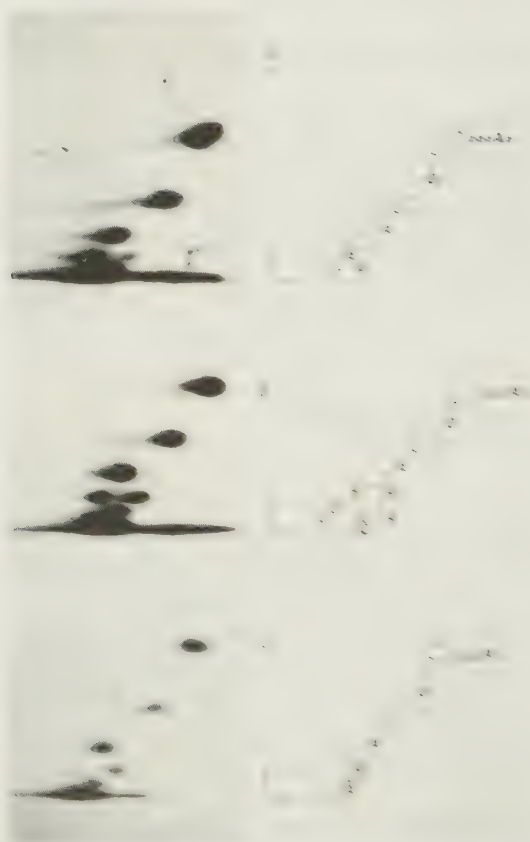


Fig. 62

Sequenzanalyse des 5'-Terminus der H4 RNA durch "modified-shoot"-Analyse

Das Produkt der gezielt alkalisch hydrolysierten [32 P]-ATP-markierten H4 RNA wurde in der ersten Dimension durch Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat bei pH 3,5 und in der zweiten Dimension durch aufsteigende Chromatographie auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten in 10 mM Hämoxid angereicht.

Um diese zu prüfen, wurde die RNA, welche zwischen den sequenzierten RNA-Spezies im Gel läuft, ebenfalls sequenziert (Fig. 40 B). Man erkennt, daß in der Tat der vierte Fleck des Fingerprints gleiche Intensität aufweist, was nur bedeuten kann, daß die RNA-Sequenzen beider RNA-Spezies in diesem Fingerprint vorhanden sind. Es handelt sich folglich bei dieser Zone um eine Mischung der Zone A mit Zone C. Da die Chromatographie bei diesem Experiment länger gelaufen ist, erlaubt dieser Fingerprint die Bestimmung eines weiteren Nukleotids beider RNAs. Die Sequenz der RNA aus Zone C und A lautet: pppAGAAGC; pppAGAGAC.

Bei dem Vergleich der RNA-Sequenz pppAGAGAC mit der DNA-Sequenz fällt auf, daß dieses Hexanukleotid nicht in der Matrize enthalten ist, wohl aber die Tetranukleotidsequenz AGAG (Position 138-141), welche nur einmal in der DNA vorkommt. Nimmt man an, daß die RNA Polymerase bei der Transkription einen Fehler bei der Ablesung von Purinen machen kann, so ergäben sich folgende drei Möglichkeiten der Erklärung:

1. Die Polymerase startet beide Transkripte an derselben Position (Position 143) in der DNA und benützt ein Guanin und Adenin anstatt Adenin und Guanin.

131	140	150
5'-TATACTAAGAGGAGAAGCGC-3'		
5'-pppAGAGAC		

2. Die RNA-Polymerase initiiert fünf Basenpaare vor dieser Startstelle an Position 138. Für diesen Fall müßte man jedoch zwei Postulate aufstellen, nämlich eine Verschiebung des Promotors um etwa 6 Bp und zwei Ablesefehler an den Positionen 142 und 143

131	140	150
5'-TATACTAAGAGGAGAAGCGC-3'		
5'-pppAGAGAC....		

3. Die RNA Polymerase springt bei der Initiation der RNA-Synthese. Dieser Mechanismus der diskontinuierlichen Transkription würde eine Reinitiation des naszierenden Transkripts voraussetzen, eine Hypothese, welche für die veränderlichen Trypanosomen-Oberflächen-Antigene diskutiert wird (Campell et al., 1984).

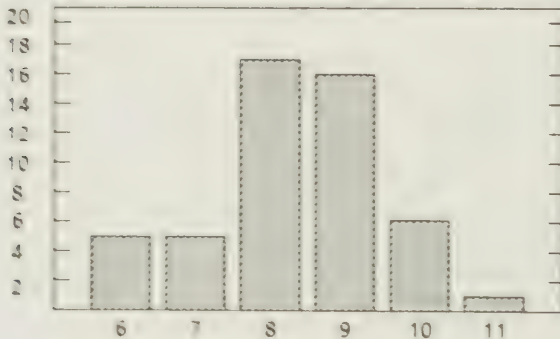
DISKUSSION

Bei der Initiation der Transkription bindet die RNA-Polymerase aus E. coli an einen etwa 60 Bp langen DNA-Bereich, der als Promotorregion bezeichnet wird (Siebenlist et al., 1980; Chenchick et al., 1981). Durch Sequenzvergleich einer gewissen Anzahl dieser Promotorregionen wurden zwei Hexanukleotidsequenzen vor der RNA-Startstelle ermittelt, die ein gewisses Maß an Übereinstimmung zeigten (Rosenberg und Court, 1979; Hawley und Mc Clure, 1983). Diese beiden Abschnitte, die etwa 15-21 Bp und im günstigsten Fall 17 Bp (Stephano und Gralla, 1982) voneinander entfernt sind, werden als -10- Region oder Pribnow-Schaller-Box und -35-Region bezeichnet und sind, wie ihre Bezeichnung widerspiegelt, ungefähr 10 und 35 Bp von der RNA-Startposition entfernt. Nukleotide, die in diesen beiden Sequenzen jeweils am häufigsten auftraten, wurden zu einer künstlichen Sequenz kombiniert, die als Promotor-Consensus-Sequenz bezeichnet wird.

Auffallend jedoch ist, daß bei keinem der mir bekannten natürlich vorkommenden Promotoren diese Consensus-Sequenz zu finden ist. Dennoch bestehen gewisse Übereinstimmungen natürlicher E. coli Promotoren mit dieser Sequenz. So zeigen beispielsweise 108 von 112 Promotoren ein T an der letzten Position der -10-Region. Auch andere Positionen in diesen beiden Bereichen zeigen noch gewisse, jedoch geringere Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz. Als Beispiel sei hier das Trinukleotid TTG in der -35-Region und das Dinukleotid TA in der -10-Region erwähnt. Um ein Höchstmaß an Übereinstimmung zwischen Consensus-Sequenz und nativen Promotoren zu erzielen, wurde jedoch sowohl der Abstand zwischen der -10-und -35-Region, als auch die Entfernung zwischen der RNA-Startstelle und der Pribnow-Schaller-Box variabel gehalten (Hawley und Mc Clure, 1983).

Aus diesen Daten wird ersichtlich, daß keine einheitliche Promotorsequenz in E. coli existiert. Ein Grund dafür ist sicherlich, daß durch die Variation der Promotor-Sequenz die Stärke eines Promotors beeinflußt wird, was für die Regulation der Genexpression von Bedeutung ist. In diesem Zusammenhang sei auf CAP-abhängige Promotoren hingewiesen, an welche die RNA Polymerase nur in Anwesenheit des CAP-Proteins (cAMP-binding protein) binden kann. Aus genetischen Arbeiten geht hervor, daß Mutationen, die die

Promotorstärke beeinflussen, sich größtenteils in den Positionen um -10 und -35 befinden. Mutationen, die die Homologie zu der Consensus-Sequenz erhöhen, steigern die Promotoraktivität *in vivo*. Basenaustausche, die die Homologie verringern, haben meist geringere Aktivität des Promotors zur Folge (Yoderian *et al.*, 1982). Auch ein chemisch synthetisierter *E. coli* Consensus-Sequenz-Promotor ist *in vivo* und *in vitro* aktiv (Ross *et al.*, 1983), was auf eine funktionelle Bedeutung dieser DNA-Regionen hinweist. Bei näherer Betrachtung der Consensus-Sequenz fällt auf, daß diese sehr AT-reich ist. Von zwölf Desoxynukleotidpaaren sind zehn AT-Basenpaare. Um zu untersuchen, ob dieser hohe AT-Gehalt auch wirklich ein Charakteristikum natürlicher *E. coli* Promotoren darstellt, habe ich diesen von 50 *E. coli* Promotoren (Hawley und McClure, 1983) ermittelt. Es zeigte sich jedoch, daß bis auf sieben Ausnahmen alle Promotoren einen etwas niedrigeren AT-Gehalt in der -10 und -35-Region aufwiesen (Fig. 41).



Summe der AT-Basenpaare in der -10- und -35-Region von 50 *E. coli* Promotoren

Fig. 41 Untersuchung des AT-Gehalts der ersten 50 *E. coli* Promotoren nach Hawley und McClure (1983)

Der geringste AT-Gehalt von 50 Mol % wurde bei fünf Promotoren (10%) festgestellt. Die meisten Promotoren (66%) hatten 67- und 75 Mol % AT. Lediglich 12% der untersuchten Promotoren hatten den gleichen AT-Gehalt wie die Consensus-Sequenz. Damit wird ersichtlich, daß E. coli Promotoren in ihren konservierten Bereichen in der Tat AT-reich sind.

Es liegt deshalb nahe zu vermuten, daß E. coli Promotoren in der 72 Mol% GC-haltigen Micrococcus luteus DNA nicht vorkommen. Andererseits wäre es durchaus denkbar, daß die verbleibenden AT-Basenpaare nicht nur statistisch im Genom verteilt sind, sondern in bestimmten DNA-Bereichen so angeordnet sind, daß sie einen funktionsfähigen Promotor ergeben. Die Shotgun-Klonierung von M. luteus DNA in ein E. coli Promotorselektionsplasmid ergab, daß in M. luteus DNA in der Tat solche Sequenzabschnitte existieren, welche in E. coli Zellen als Promotoren wirken. Da M. luteus Polymerase *in vitro* an E. coli Promotoren definierte RNAs synthetisieren kann (Brack *et al.*, 1985), wäre es durchaus denkbar, daß auch M. luteus Polymerase diese Promotoren benutzen kann. Von Streptomyces lividans (73 Mol % GC) wurde gezeigt, daß dieser Organismus E. coli Promotoren *in vivo* verwendet und in derselben Weise wie E. coli auf Promotormutationen reagiert (Jaurin und Cohen, 1984). Dies würde dafür sprechen, daß sich E. coli und M. luteus Promotoren nicht grundlegend in ihrer Sequenz unterscheiden.

Es wurden jedoch nur wenige E. coli Promotoren in M. luteus DNA gefunden, was ein Hinweis darauf sein könnte, daß sich native M. luteus und E. coli Promotoren in ihrer DNA-Sequenz unterscheiden. In diesem Zusammenhang ist auch die *in vivo* Inaktivität des spezifischen M. luteus Promotors m_{E} in E. coli zu sehen.

Dieser Promotor, der gewisse Ähnlichkeiten in der -10- und -35- Region mit der E. coli Promotor-Consensus-Sequenz aufweist, enthält jedoch signifikant mehr GC-Basenpaare, -sowohl innerhalb der konservierten Promotorbereiche, als auch außerhalb (Brack *et al.*, 1985). Dies weist darauf hin, daß der CG-Gehalt der Promotorregionen einen Einfluß auf die Transkriptionsspezifität der betrachteten RNA Polymerasen ausüben könnte. Auch Caulobacter crescentus Gene (67 Mol% CG), die einen ähnlich hohen CG-Gehalt wie M. luteus Gene enthalten werden,

in E. coli Zellen nicht transkribiert (Smit und Agabian, 1984; Ohta et al., 1982).

Unterschiede in der Selektivität der Transkription zwischen M. luteus und E. coli RNA Polymerase werden auch in vitro an fragmentierter genomischer M. luteus DNA beobachtet. An dieser Matrize synthetisiert nur das M. luteus Enzym definierte Transkripte (Fig. 14). Aus der Tatsache, daß nur die M. luteus Polymerase aus einem zellulären Fragmentgemisch diese prominenten RNAs erzeugt, deutet auf unterschiedliche Initiation der Transkription hin. Unterschiede in der Matrizerkennung zwischen E. coli und C. crescentus Polymerase an C. crescentus Phagen DNA wurden auch von Amemiya und Shapiro (1983) beobachtet. Möglich wäre auch, daß die E. coli Polymerase diese Transkripte ebenfalls synthetisieren kann und daß diese, bedingt durch eine geringere Syntheserate des E. coli Enzyms, unterhalb der Nachweisgrenze der Autoradiographie liegen. Gegen diese Möglichkeit spricht, daß bei Erhöhung der Enzym- oder DNA-Konzentration die spezifischen M. luteus Transkripte bei der Transkription mit E. coli Enzym nicht beobachtet werden (Fig. 14). Unterschiede in der Transkriptionsselektivität zwischen M. luteus und E. coli werden auch bei der Transkription an einem 380 Bp langen klonierten M. luteus DNA Fragment beobachtet. An dieser Matrize katalysiert die M. luteus Polymerase zwei Transkripte, die mit E. coli Enzym nicht beobachtet werden (Fig. 29). Da beide Polymerasen an dieser Matrize ein uneinheitliches Muster niedermolekularer Stotterprodukte erzeugen, wird ersichtlich, daß der beobachtete Unterschied in der Transkriptioninitiation und nicht in der Termination zu suchen ist (Lee et al., 1980). Für unterschiedliche Initiation dieser Transkripte spricht weiterhin, daß eubakterielle RNA-Polymerasen identisch rho-unabhängig terminieren (Brack et al., 1983; Wiggs et al., 1979). Auch bei der Transkription an dem 230 Bp langen M. luteus Fragment unterscheiden sich beide Enzymspezies im Transkript-Muster (Fig. 30).

Dieser Selektivitätsunterschied ist jedoch nicht auf das Micrococcus-Enzym beschränkt; auch mit E. coli RNA Polymerase wurden an M. luteus DNA-Fragmenten spezifische RNAs gefunden, die die M. luteus Polymerase nicht synthetisieren konnte (Fig. 27).

Aus diesen Experimenten wird ersichtlich, daß es unterschiedliche Parameter in der Enzym-Promotor-Wechselwirkung bei den beiden

Polymerase-Spezies geben muß, die diese unterschiedliche Transkriptionsselektivität bewirken. Peptidchemische und immunologische Untersuchungen zeigen, daß zwischen M. luteus und E. coli RNA Polymerase nur geringe Verwandtschaft besteht (Leib et al., 1980). So zeigt beispielsweise die kleinste Untereinheit der M. luteus RNA Polymerase in einem Fingerprint-Experiment nur geringe Übereinstimmung mit dem entsprechenden E. coli Polypeptid. Jedoch kann der Unterschied zwischen den Enzymspezies nicht allzu groß sein, da sich enzymatisch aktive Enzymhybride aus den verschiedenen isofunktionellen Untereinheiten der Polymerasen bilden lassen, was für gemeinsame funktionelle und strukturelle Organisation der Enzyme spricht (Lill et al., 1974; Lill and Hartmann, 1977). Eine Untereinheit der M. luteus Polymerase, der sog. Sigmafaktor, ermöglicht dem Enzymhybrid, bestehend aus E. coli Coreenzym und Micrococcus-Sigma selektiv, wie das M. luteus- Holoenzym an dem spezifischen M. luteus Promotor m_{ϕ} aus $\phi X174$ zu initiieren (Ernst, 1981), eine Fähigkeit, die E. coli Coreenzym und Holoenzym nicht besitzen. Der Sigmafaktor scheint auch für sich die Hauptkomponente der Promotorselektivität bei E. coli darzustellen. Experimente von Nomura et al. (1984) zeigen, daß Mutationen im *rpoD*-Gen, welches für die E. coli Polymerase-Untereinheit Sigma codiert, veränderte Promotorselektivität des Holoenzym in vitro zur Folge haben.

Andere Promotorerkennung und damit unterschiedliche Promotorselektivität wird auch durch den Austausch eines Sigmafaktors durch einen anderen in vivo innerhalb eines Organismus beobachtet (Doi, 1982). Demzufolge könnten sich im Laufe der Evolution der M. luteus- und der E. coli-Sigmafaktor in ihrer Primärsequenz, welche die räumliche Anordnung der Polypeptidketten bestimmt und somit für die Promotor-Enzym-Wechselwirkung verantwortlich ist, so voneinander entfernt haben, daß speziesspezifische Promotorerkennung an bestimmten Matrizen unter Beibehaltung der katalytischen Fähigkeit möglich wurde. Diese Entwicklung würde dem erhöhten GC-Gehalt der M. luteus DNA Rechnung tragen.

Betrachtet man nach diesem Gesichtspunkt die Basenzusammensetzung des DNA-Abschnitts, die der Startstelle des von mir untersuchten M. luteus spezifischen Transkripts (Fig. 30; Fig. 32 rechts) vorausgeht, mit bekannten M. luteus Promotoren in $\phi X174$ RF - und pBR322-DNA, so fällt in der Tat der hohe GC-Gehalt des nativen M. luteus Promotors von 58 Mol % GC auf (Fig. 42). Vergleicht man diese drei Promotoren

	<u>-35-Region</u>			<u>-10-Region</u>		
	-60	-50	-40	-20	-10	+1
nativer <i>M. luteus</i> Promotor	• ACCGTGAACACCGGGCTCCACCC			GATACCCCGGGGGTA	TATACT	AAGAGG•
		71 Mol% CG		70 Mol% CG	17 Mol% GC	
<i>mE.</i> Promotor	TACTGACCGCTCTCGTGTCTCGT			GAGGCTTGCGTTTATGG	TACGCT	GGACTTTG
		63 Mol% GC		53 Mol% CG	50 Mol% GC	
RNA 1 - Promotor	TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTT			TGGTGGCCTAACTACGGC	TACACT	AGAAAGGA
		48 Mol% GC		61 Mol% CG	33 Mol% GC	
	<i>E. coli</i> Consensus				TATAAT	
	TTGACA					

Fig. 42

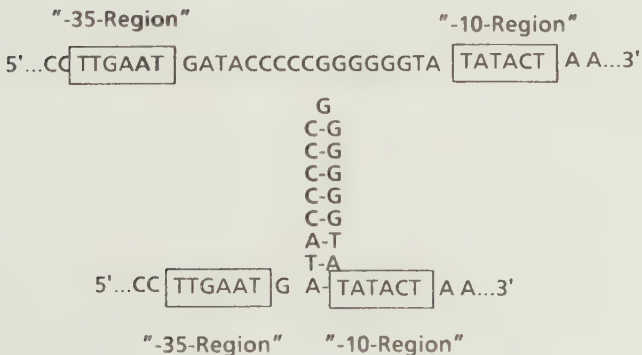
Vergleich der DNA-Sequenz von *M. luteus* Promotoren

Die DNA-Sequenz des RNA 1- und *mE*-Promotors wurde aus Brack et al. (1985) entnommen.

miteinander, so sieht man, daß es ähnlich wie bei *E. coli* Promotoren keine universelle *M. luteus* Promotorsequenz zu geben scheint. Jedoch existieren auch hier geringe Übereinstimmungen in gewissen Bereichen, welche als essentiell für die Wirkung eines *E. coli* Promotors angesehen werden (Fig. 42).

So enthält die "-10-Region" zwei Dinukleotide TA (Position -11 und -12) und CT (Position 7 und 8); die "-35-Region" ein Dinukleotid CT (Position -35 und -36). Daß diese beiden Regionen, welche einen Abstand von 17 Bp voneinander haben, von funktioneller Bedeutung für die Promotoraktivität sein könnten, zeigt die Unterdrückung der RNA-Synthese an *Sma* I hydrolysierten DNA. Dieses Restriktionsenzym spaltet den Promotorbereich zwischen den Positionen -20 und -21 und trennt somit beide Regionen voneinander.

Insgesamt aber zeichnen sich diese beiden DNA-Abschnitte des nativen *M. luteus* Promotors im Vergleich zur *E. coli* Consensus-Sequenz nicht durch einen wesentlich höheren CG-Gehalt aus. Analysiert man jedoch den DNA-Bereich zwischen der -10- und -35-Region unter diesem Gesichtspunkt, so fällt der hohe GC-Anteil dieses DNA-Bereiches auf (Fig. 42). Es ist interessant, daß der native *M. luteus* Promotor in dieser Region eine ausgesprochene Sekundärstruktur ausbilden kann, welche es erlaubt, den Abstand zwischen -10- und -35-Region zu verkürzen:



E. coli Promotoren sind, von einigen Ausnahmen abgesehen in diesem Bereich AT-reich. Es ist bekannt, daß die E. coli Polymerase mit diesem Promotorbereich in Wechselwirkung steht. Chenchick et al. (1981) konnten zeigen, daß sich die ϵ -Aminogruppe von Lysinresten der Polymerase-Untereinheiten in diesem DNA-Bereich konvalent an die teilweise depurinisierte DNA binden läßt. Eine weitere Charakteristik des nativen M. luteus Promotors ist der hohe CG-Gehalt von 71 Mol% GC zwischen Position -37 und -60. Möglicherweise spielt auch die Sequenz dieser Region eine Rolle bei der Initiation der Transkription, da ein Restriktionschnitt bei Position -71 auf pBR322 zur Unterdrückung der RNA I -Synthese durch M. luteus Enzym führt (siehe Fig. 42; Brack, 1983). Eine weitere strukturelle Besonderheit des nativen M. luteus Promotors, welche ich nicht unerwähnt lassen möchte, ist in dem DNA-Bereich zu finden, welcher die Startstelle der RNA(s) enthält. Man sieht, daß die Pentanukleotid-Sequenz 5'-AAGAG-3' in umgekehrter Orientierung zweimal auf demselben DNA-Strang auftritt.



Ob diese Struktur, zusammen mit der in der "Spacer"-Region gefundenen Sequenz, eine Rolle bei der Entstehung des im Ergebnisteil diskutierten zweiten Transkripts spielt, muß noch durch weitere Experimente geklärt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die RNA-Polymerasen aus M. luteus und E. coli unterscheiden sich in der Selektivität der Transkription in vivo und in vitro. Dies wird durch folgende Experimente gezeigt:

1. Die von Ernst et al. (1982) [Eur. J. Biochem. 124, 427-433] an ϕ X174 DNA entdeckte M. luteus Promotorsequenz m_E zeigt in E. coli-Zellen in vivo keine Aktivität.
2. Die in vitro Transkription an fragmentierter zellulärer M. luteus DNA ergab nur mit M. luteus Polymerase selektive und starke Transkripte. Auch durch Erhöhung der DNA- oder Enzymkonzentration konnten bei der Reaktion mit E. coli Polymerase keine Transkripte beobachtet werden. Die Gene für die starken Transkripte wurden kloniert.
3. Durch "Shotgun"-Klonierung von M. luteus DNA in einem E. coli Promotorselektionsplasmid (pPV33) wurde gezeigt, daß E. coli RNA-Polymerase nur wenige DNA-Abschnitte in M. luteus DNA als Promotoren erkennt. Bei der vergleichenden in vitro Transkription an diesen klonierten Fragmenten wurden M. luteus oder E. coli spezifische Transkripte gefunden, die nach verschiedenen Kriterien unterschiedlich an der Matrize gestartet werden.

Ein M. luteus DNA-Fragment, welches einen nativen M. luteus Promotor enthielt, wurde sequenziert. Die Lage des Promotors in der DNA wurde anhand der Längen von Abbruchtranskripten, durch abortive Initiation und durch Sequenzierung des 5'-Terminus der RNA lokalisiert. Dieser Promotor zeichnet sich durch einen hohen GC-Gehalt zwischen zwei AT-reichen DNA-Abschnitten aus, welche etwa 10 und 35 Bp von der RNA-Startstelle entfernt sind. An diesem nativen Promotor zeigt die M. luteus RNA-Polymerase in vitro eine Präferenz für hohe Ionenstärken.

Die in vitro Transkription, von vier auf unterschiedliche Weise angereicherten M. luteus RNA-Polymerase-Präparationen, ergab keinen Hinweis auf einen von $^m\sigma$ verschiedenen, weiteren Transkriptionsfaktor in M. luteus.

LITERATURVERZEICHNIS

- Amemiya, K. and Shapiro, L. (1983)
Differential Template Recognition by the Caulobacter Crescentus
and the Escherichia coli RNA Polymerases.
J. Biol. Chem. **258**, 8984-8992.
- Benton, W.D., and Davis, R.W. (1977)
Screening Lambda gt recombinant clones by hybridization in situ.
Science **196**, 180-182.
- Birnboim, H.C. (1983)
A Rapid Alkaline Extraktion Method for the Isolation of Plasmid
DNA.
Methods in Enzymology **100**, 243 - 255
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L.,
Boyer, H.W., Crosa, J.H., and Falkow, S. (1977)
Construction and Characterization of New Cloning Vehicles.
II. A Multipurpose Cloning System.
Gene **2**, 95-113.
- Brack, R. (1983)
In vitro Transkription of the Escherichia coli Plasmid pBR322 with
RNA Polymerase from Micrococcus luteus.
Dissertation, Universität München.
- Brack, R.P., Domdey, H. and Hartmann G.R. (1984)
Synthesis of RNA I by the RNA polymerase from Micrococcus luteus
on the Escherichia coli plasmid pBR322.
Eur. J. Biochem. **141**, 453-459.
- Brack, R.P., Rauschel, B., and Hartmann, G.R. (1985)
Regulation of Transkription by Promoters and Terminators.
Cellular Regulation and Malignant Growth.
(Ebashi, S.ed.), pp. 116-122, Japan Sci. Soc.
Press, Tokyo / Springer-Verlag, Berlin (1985).
- Burgess, R.R. and Jendrisak, J.J. (1975)
A Procedure for the Rapid, Large-Scale Purification of Escherichia
coli DNA-Dependent RNA Polymerase Involving Polymyxin P
Precipitation and DNA-Cellulose Chromatography.
Biochemistry **14**, 4634-4638.
- Campell, A.D., Thornton, D.A. and Boothroyd, I.C. (1984)
Apparent discontinuous transkription of Trypanosoma brucei
variant surface antigen genes.
Nature **311**, 350 - 355.
- Chamberlin, M.J., Nierman, W.C., Wiggs, J. and Neff, N. (1979)
A Quantitative Assay for Bacterial RNA Polymerases.
J. Biol. Chem. **254**, 10061-10069.

- Chamberlin, M., Kingston, R., Gilman, M., Wiggs, J., and DeVera, A. (1983)
Isolation of Bacterial and Bacteriophage RNA Polymerases and Their Use in Synthesis of RNA *in Vitro*.
Methods in Enzymology **101**, 540-568.
- Chapman, K.A., and Wells, R.D. (1982)
Bacteriophage T7 late promoters: construction and *in vitro* transcription properties of deletion mutants.
Nucleic Acids Res. **10**, 6331-6340.
- Chater, K.F. (1982)
Streptomyces in the ascendant.
Nature **299**, 10-11.
- Chenckick, A., Beabealashvilli, R. and Mirzabekov, A. (1981)
Topography of Interaction of *Escherichia Coli* RNA Polymerase Subunits with lac UV 5 Promotor.
FEBS Lett. **128**, 46 - 50.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1976)
A colony bank containing synthetic ColE1 Hybrid Plasmids representative of the entire *E. coli* genome.
Cell **9**, 91-99.
- Costanzo, M. and Pero, J. (1983)
Structure of a *Bacillus subtilis* bacteriophage SP01 gene encoding a RNA polymerase σ factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 1236-1240.
- Cowing, D.W., Bardwell, J.C.A., Craig, E.A., Woolford, R.W., and Gross, C.A. (1985)
Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 2679-2683.
- Davanloo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Studier, W.F. (1983)
Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 2035-2039.
- Doi, R.H. (1982a)
RNA Polymerase of *Bacillus subtilis*.
The Molecular Biology of the Bacilli Vol. 1 in Molecular Biology Edited by David A. Dubnau
Academic Press.
- Doi, R.H. (1982b)
Multiple RNA Polymerase Holoenzymes Exert Transkriptional Specificity in *Bacillus subtilis*.
Arch. Biochem. Biophys. **214**, 772-781.

- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D.R. (1980)
Broad hostrange DNA cloning system for Gramnegative bacteria:
Construction of a gene bank of Rhizobium meliloti.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 7347-7351.
- Dugaiczky, A., Boyer, H.W., and Goodman, H.M. (1975)
Ligation of Eco R I endonuclease generated DNA fragments into
linear and circular structures.
J. Mol. Biol. **96**, 171-184.
- Elliott, T. and Geiduschek, P.E. (1984)
Defining a Bacteriophage T4 Late Promoter:
Absence of a "-35" Region.
Cell **36**, 211-219.
- Ernst, E. (1981)
Transkription der ϕ X174 DNA durch die RNA Polymerase aus
Micrococcus luteus und Escherichia coli und der dirigierende
Einfluß der Untereinheit Sigma.
Dissertation, Universität München.
- Ernst, H., Hartmann, G.R., and Domdey, H. (1982)
Species Specificity of Promoter Recognition by RNA Polymerase
and Its Transfer by the Sigma Factor.
Eur. J. Biochem. **124**, 427-433.
- Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, A. and Murray, N. (1983)
Lambda Replacement Vectors Carrying Polylinker Sequences.
J. Mol. Biol. **170**, 827-842.
- Glaser, G., Sarmientos, P., and Cashel, M. (1983)
Functional interrelationship between two tandem E. coli
ribosomal RNA promoters.
Nature **302**, 74-76.
- Grossmann, A.D., Erickson, J.W. and Gross, C.A. (1984)
The htpR Gene Product of E. coli Is a Sigma Factor for Heat-Shock
Promoters.
Cell **38**, 383-390.
- Grundstein, M. and Hogness, D.S. (1975)
Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs
that contain a specific gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3961-3965.
- Haldenwang, G.W. and Losick, R. (1979)
A modified RNA polymerase transcribes a cloned gene under
sporulation control in Bacillus subtilis.
Nature **282**, 256-260.
- Hawley, D.K. and McClure, W.R. (1983)
Compilation and analysis of Escherichia coli Promoter DNA
sequences.
Nucleic Acids Res. **11**, 2237-2255.

- Hartl, P. (1984)
Isolierung und Charakterisierung von c-myc und c-k-enthaltenden
 λ -Klonen aus Burkitt-Lymphomen mit 2,8 Translokationen.
Diplomarbeit, Institut für Biochemie der Universität München.
- Hohn, B. (1979)
In vitro packaging of Lambda and Cosmid DNA
Methods in Enzymology 68, 299-309.
- Hillen, W., Schollmeier, K., and Gratz, C. (1984)
Control of Expression of the Tn 10-encoded Tetracycline Resistance
Operon
II. Interaction of RNA Polymerase and TET Repressor with the tet
Operon Regulatory Region.
J. Mol. Biol. 172, 185-201.
- Jaehning, A.J., Wiggs, J.L., and Chamberlin, M. (1979)
Altered promoter selection by a novel form of Bacillus subtilis RNA
Polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5470-5474.
- Jaurin, B. and Cohen, S.N. (1984)
Streptomyces lividans RNA Polymerase recognizes and uses
Escherichia coli transcriptional signals.
Gene 28, 83-91.
- Johnson, C.W., Moran, C.P.Jr. and Losick, R. (1983)
Two RNA polymerase sigma factors from Bacillus subtilis
discriminate between overlapping promoters for a
developmentally regulated gene.
Nature 302, 800-804.
- Jolliffe, L.K., Carter, A.D. and McAllister, W.T. (1983)
Identification of a potential control region in bacteriophage T7
late promoters.
Nature 299, 653-656.
- Kassavetis, G.A., and Geiduschek, P. (1984)
Defining a bacteriophage T4 late promoter:
Bacteriophage T4 gene 55 protein suffices for directing late
promoter recognition.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5101-5105.
- Kikuchi, Y., Kazimierz, T., Filipowicz, W., Sanger, H.L. and Gross, H.J.
(1982)
Circularization of linear viroid RNA via 2'-phosphomonoester, 3',
5'-phosphodiester bonds by a novel type of RNA ligase from
wheat germ and Chlamydomonas.
Nucleic Acids Res. 10, 7521-7529.
- Krause, H.M., Rothwell, M.R., and Higgins, N.P. (1983)
The early promoter of bacteriophage Mu:
definition of the site of transcript initiation.
Nucleic Acids Res. 11, 5483-5495.

- Landick, R., Vaughn, V., Lau, E.T., VanBogelen, R.A., Erickson, I.W. and
Neinhardt, F.C. (1984)
Nucleotide Sequence of the Heat Shock Regulatory Gene of E. coli
Suggests Its Protein Product May Be a Transcription Factors.
Cell **38**, 175-182.
- Langridge, J., Langridge, P. and Berquist, P.L. (1980)
Extraction of Nucleic Acids from agarose gels.
Analytical Biochemistry **103**, 264 - 271
- Lee, G., Talkington, C. and Pero, J. (1980)
Nukleotid Sequence of a Promotor Recognized by Bacillus subtilis
RNA Polymerase.
Molec. Gen. Genet. **180**, 57-65.
- Leib, C., Ernst, H. and Hartmann, G.R. (1980)
"Recognition of Promoter Sequences by RNA Polymerases from
Different Sources",
in "Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics"
(A. Kleinzeller, G.F. Springer and H.G. Wittmann, eds.),
Vol. **32** (Chemical Recognition in Biology F. Chapeville and A.-L.
Haenni, eds.)
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1980, pp. 301 - 307.
- Lill, U.I. and Hartmann, G. R. (1977)
Formation of a RNA Polymerase Sub-Assembly
Composed of Subunit α from Escherichia coli and of Subunit β from
Micrococcus luteus.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **358**, 1605-1608.
- Lill, U.I., Kniep-Behrendt, E.M., Bock, L. and Hartmann, G.R. (1977)
Purification and Characterization of DNA-Dependent
RNA Polymerase and its Subunit α from Micrococcus luteus.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **358**, 1591-1603.
- Lill, U. I., Behrendt, E.M., and Hartmann, G. R. (1975)
Hybridization in vitro of Subunits of the DNA-Dependent RNA
Polymerase from Escherichia coli and Micrococcus luteus.
Eur. J. Biochem. **52**, 411-420.
- Lowe, P. A., Hager, D. A. and Burgess, R. R. (1979)
Purification and Properties of the α Subunit of Escherichia coli
DNA-Dependent RNA Polymerase.
Biochemistry **18**, 1344 - 1352.
- Losick, R. and Chamberlin, M. (editors) (1976)
RNA Polymerase
Cold Spring Harbor Laboratory.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning: a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory.

- Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977)
A new method for sequencing DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564.
- McClure, W.R. (1980)
Rate-limiting steps in RNA chain initiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5634-5638.
- Milhausen, M., Gill, P.R, Parker, G. and Agabian, N. (1982)
Cloning of developmentally regulated flagellin genes from
Caulobacter crescentus via immunoprecipitation of polyribosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6847-6851.
- Mulligan, M.E., Brosius, J., and McClure, W.R. (1985)
Characterization in Vitro of the Effect of Spacer Length on the
Activity of Escherichia coli RNA Polymerase at the TAC Promoter.
J. Biol. Chem. 260, 3529-3538.
- Neve, L.R., West, R.W. and Rodriguez, R.L. (1979)
Eukaryotic DNA fragments which act as promoters for a plasmid
gene.
Nature 277, 324-325.
- Nomura, T., Ishihama, A., Kajitani, M., Takahashi, T., Nakada, N., and
Yoshinga, K (1984)
Promoter Selectivity of Escherichia coli RNA Polymerase.
Mol. Gen. Genet. 193, 8-16.
- Norlander, J., Kempe, T., and Messing, J. (1983)
Construction of improved M13 vectors using
oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis.
Gene 26, 101-106.
- Ohta, N., Chen, L.-S., and Newton, A. (1982)
Isolation and expression of cloned hock protein gene from
Caulobacter crescentus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4863-4867.
- Rauschel, B.S. (1982)
Isolierung und Charakterisierung eines enzymatisch aktiven RNA-
Polymerase Coreenzyms aus Micrococcus luteus.
Diplomarbeit, Institut für Biochemie der Universität München.
- Rodriguez, R.L. and Tait, R.C. (1983)
Recombinant DNA Techniques: An Introduction.
Addison-Wesley Publishing Company.
- Rosenberg, M. and Court, D. (1979)
Regulatory Sequences Involved in the Promotion and Termination
of RNA Transcription.
Annu. Rev. Genet. 13, 319-353

- Rossi, J.J., Soberon, X., Marumoto, Y., McMahon, J. and Itakura, K. (1983)
Biological expression of an *Escherichia coli* consensus promoter and some mutant derivatives.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3203-3207.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
- Schildkraut, C.L., Marmur, J. and Doty, P. (1962)
Determination of the Base Composition of Deoxyribonucleic Acid from its Buoyant Density in CsCl.
J. Mol. Biol. 4, 430-443.
- Schleif, R.F., and Wensink, P.C. (1981)
Practical Methods in Molecular Biology
Springer-Verlag, New York Heidelberg Berlin.
- Siebenlist, U., Simpson, R. B., and Gilbert, W. (1980)
E. coli RNA Polymerase Interacts Homologously with Two Different Promoters.
Cell 20, 269 - 281.
- Silberklang, M., Gillum, A.M. and RajBhandary, U.L. (1979)
Use of *in Vitro* ³²P Labeling in the Sequence Analysis of Nonradioactive tRNAs.
Methods Enzymol. 59, 58 - 109
- Smit, J. and Agabian, N. (1984)
Cloning of the Major Protein of *Caulobacter crescentus* Periodic Surface Layer: Detection and Characterization of the Cloned Peptide by Protein Expression Assays.
J. Bacteriol. 160, 1137-1145.
- Soberon, X., Covarrubias, L. and Bolivar, F. (1980)
Construction and Characterization of new cloning vehicles IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325.
Gene 9, 287-305.
- Southern, E. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis
J. Mol. Biol. 98, 503 - 517.
- Stefano, J. E. and Gralla, J. D. (1982)
Spacer mutations in the *lac ps* promoter.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1069 - 1072

- Talkington, C. and Pero, J. (1979)
Distinctive nucleotide sequences of promoters recognized by RNA Polymerase containing a phage-coded " σ -like" protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5465-5469.
- Thompson, C.J. and Gray, G.S. (1983)
Nucleotide sequence of a streptomycete aminoglycoside phosphotransferase encoded by resistance plasmids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5190-5194.
- Travers, A.A. and Burgess, R.R. (1969)
Cyclic re-use of the RNA Polymerase sigma factor.
Nature 222, 537-540.
- Travers, A. (1985)
Sigma factors in multitude.
Nature 313, 15-16.
- Tu, C.-P.D. and Wu, R. (1980)
Sequence Analysis of Short DNA Fragments.
Methods in Enzymology, Vol. 65 Nucl. Acids, Part I, pp. 620-638.
- Vieira, J., and Messing, J. (1982)
The pUC plasmides, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene 19, 259-268.
- West, W.R.Jr. and Rodriguez, R.L. (1982)
Construction and characterization of E. coli promoter-probe vectors
III. pBR322 derivatives with deletions in the tetracycline resistance promoter region.
Gene 20, 291-304.
- Westpheling, I., Ranes, M. and Losick, R. (1985)
RNA Polymerase heterogeneity in Streptomyces coelicolor.
Nature 313, 22-27.
- Wieslander, L. (1979)
A Simple Method to Recover Intact High Molecular Weight RNA and DNA after Electrophoretic Separation in Low Gelling Temperature Agarose Gels.
Analytical Biochemistry 98, 305 - 309.
- Wiggs, I.L, Bush, I.W. and Chamberlin, M.J. (1979)
Utilization of Promoter and Terminator Sites on Bacteriophage T7 DNA by RNA Polymerases from a Variety of Bacterial Orders.
Cell 16, 97-109.
- Wiggs, J.L., Gilman, M.Z. and Chamberlin, M.J. (1981)
Heterogeneity of RNA polymerase in Bacillus subtilis: Evidence for an additional σ factor in vegetative cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2762-2766.

- Winberg, G. and Hammarskjöld, M.-L. (1980)
Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper.
Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA.
Nucl. Acids Res. **8**, 253 - 264.
- Winkler, M.E., Schoenlein, P.V., Ross, C.M., Barrett, J.T. and Ely, B. (1984)
Genetic and Physical Analyses of Caulobacter Crescentus trp genes.
J. Bacteriol. **160**, 279-287.
- Wu, T.-H., Wood, D.L., Stein, P.L., and Comer, M.M. (1984)
Transcription of a Gene Cluster Coding for Two Aminoacyl-t RNA
Synthetases and an Initiation Factor in Escherichia coli.
J. Mol. Biol. **173**, 177-209.
- Youdarian, P., Bouvier, S. and Susskind, M.M. (1982)
Sequence Determinants of Promoter Activity.
Cell **30**, 843-853.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Bernd S. Rauschel
Geburtsdatum	11. Dezember 1953
Geburtsort	Deggendorf
Familienstand	Verheiratet seit August 1984
	Ein Kind, geb. 7. März 1985
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulausbildung

1960 - 1963	Alte Knabenschule Deggendorf
1963 - 1965	Volksschule II am Dom-Pedro- Platz in München
1965 - 1975	Rupprecht-Gymnasium München
21.6.1975	Abitur (Mathematisch-natur- wissenschaftlicher Zweig)

Studium

Nov. 1975 - Okt. 1976	Studium der Geologie an der Universität München
Nov. 1976 - Nov. 1980	Studium der Biologie an der Universität München
November 1978	Diplom-Vorprüfung
November 1980	Diplom-Hauptprüfung
Febr. 1981 - Jan. 1982	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Hartmann am Institut für Biochemie der Universität München

Februar 1982 - 1985

Doktorarbeit unter Anleitung
von Prof. Dr. G. Hartmann am
selben Institut

